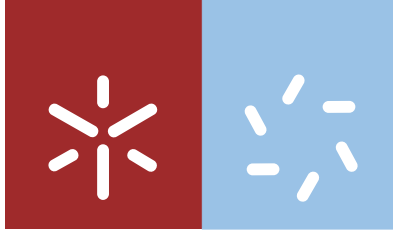


**Espetroscopia de fluorescência resolvida
no tempo em estruturas nanoplasmonicas
baseadas em grafeno**

Hugo Manuel Castro Gonçalves





Universidade do Minho

Escola de Ciências

Hugo Manuel Castro Gonçalves

**Espetroscopia de fluorescência resolvida
no tempo em estruturas nanoplasmonicas
baseadas em grafeno**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho realizado sob a orientação do
Investigador Doutor Peter Schellenberg
e do
Professor Doutor Michael Scott Belsley

outubro de 2013

Nome:

Hugo Manuel Castro Gonçalves

Endereço electrónico: pg19638@alunos.uminho.pt

Telefone: 939517086

Número do Bilhete de Identidade: 13003344

Título dissertação:

Espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo em estruturas nanoplasmonicas baseadas em grafeno

Orientadores:

Investigador Doutor Peter Schellenberg,,

Professor Doutor Michael Scott Belsley

Ano de conclusão: 2013

Designação do Mestrado:

Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, ____/____/____

Assinatura: _____

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, ____/____/____

Assinatura: _____

Agradecimentos

Eu estou profundamente grato às seguintes pessoas e organizações pelo seu incondicional apoio e ajuda na realização da minha dissertação de mestrado:

Doutor Peter Schellenberg pelo seu apoio, suporte, motivação e compromisso total comigo. Estou extremamente agradecido por me ter inserido numa área de investigação fascinante.

Doutor Michael Belsley pela total disponibilidade e ajuda aquando de eu ser inserido no laboratório de femtosegundos, e as suas observações úteis sobre a montagem experimental.

Ao amigo e colega César Bernardo pela sua persistência e audácia que tornaram a realização desta dissertação uma tarefa simples e realizável. Pela aplicação do tratamento químico as amostras de grafite o que fez da obtenção de amostras de grafeno uma tarefa menos penosa, e pelas numerosas e calorosas discussões.

Ao amigo e colega José Ramos pela revisão ortográfica e as suas cirúrgicas observações ao qual eu estou verdadeiramente agradecido.

Doutor Eduardo Pereira pela sua vantajosa ajuda na montagem experimental.

Doutora Cacilda Moura pela obtenção dos espectros Raman das amostras de grafeno.

À Universidade do Minho e ao departamento e centro de física da mesma pelo suporte e material disponibilizado.

À FCT e principalmente ao Estado Português pelo apoio financeiro.

Aos amigos Luís Alves, Tiago Barbosa, Alexandra Machado, Isabela Moura, Cátia Natércia, Juan, e a todos os outros que independentemente contribuíram.

E sobre tudo à Família.

Resumo

A descoberta do grafeno, em 2004, despertou a imaginação de muitos investigadores que viram nesta estrutura bidimensional um candidato atraente para transporte balístico de energia elétrica e novos dispositivos eletro-óticos. A dispersão linear da estrutura de bandas junto ao nível de Fermi conduz à criação de dispositivos de nanoeletrônica de características únicas. Apesar de ter apenas a espessura de um único átomo, pode ser visualizado por um simples microscópio ótico, devido ao seu elevado coeficiente de absorção ($\approx 2.3\%$).

Durante esta dissertação foi otimizado e publicado um novo método de aumento do contraste do grafeno num microscópio ótico de reflexão. O método consiste em aproximar os índices de refração dos meios, acima e abaixo, do grafeno através da introdução de um líquido, com um índice de refração semelhante ao do vidro usado como suporte, entre a objetiva do microscópio e o suporte. O contraste de uma ou várias camadas de grafeno é melhorado por um fator de quatro vezes, em comparação com os valores obtidos para substratos transparentes geralmente usados em microscópio ótico de reflexão sem otimização do índice de refração.

Recentemente, grafeno também tem sido reconhecido como um material bidimensional com propriedades plasmónicas únicas exibindo uma ampla gama de propriedades extraordinárias o que faz dele um material versátil para novas aplicações nanoplasmonicas. Esta combinação do grafeno com a fotónica e *plasmonics* permite a construção de uma variedade avançada de dispositivos, tais como uma régua molecular através da inibição da fluorescência a grandes distâncias, foi nesta perspetiva que eu centrei a atenção desta dissertação. A inibição da fluorescência pelo grafeno foi estudada em função da distância que o separa de uma molécula fluorescente, onde se constatou pela primeira vez as alterações na lei da dependência da distância para grandes distâncias. Estes resultados também confirmam a existência de decaimentos transversos, o que possibilita o seu uso como ferramenta de estudo e análise de plasmões transversos em grafeno dopado.

Abstract

The discovery of graphene in 2004, sparked the imagination of many researchers who saw in this bi-dimensional structure an appealing candidate for ballistic electrical transport and novel electro-optical devices. The linear band dispersion at the Fermi level (Dirac cone) leads to unique characteristics in nanoelectronics devices. Despite being just a single atom thick, it can be optically visualized by a simple optical microscope due to the large absorption coefficient ($\approx 2.3\%$).

During this dissertation a new method to enhancement the graphene contrast in optical reflection microscope has been optimized and published. The method employs a refractive index optimization of the mediums, above and below, of graphene through the introduction of a liquid, with a refractive index that is equal to that of the glass support used, in between the microscope objective and the support. The contrast of single and few layer graphene crystals and structures can be enhanced by a factor of four compared to values commonly achieved with transparent substrates using optical reflection microscopy lacking refractive index optimization.

Recently, graphene has also been recognized as unique two-dimensional plasmonics material that displays a wide range of extraordinary properties which could lead to a variety of novel nanoplasmonics applications. This combination of graphene nanophotonics with nanoplasmonics could enable a variety of advanced devices such as a molecular ruler. The main body of this thesis is dedicated to exploring this possibility. Graphene fluorescence quenching was studied as a function of distance between a dye molecule and significant changes in the power law that describes the distance dependence were observed for the first time at large distances. These results also confirm the transverse decays, which allows their use as a tool to study and analysis of transverse plasmon in doped graphene.

Lista de Figuras

Figura 2.1 - As diferentes estruturas dos alótropos de carbono. À direita, alguns alótropos conhecidos e visualizados. À esquerda, algumas estruturas de alótropos de carbono possíveis de existir ou produzir (Sheng et al.).	6
Figura 2.2 – Estrutura cristalina do grafeno e a sua estrutura de bandas onde é possível verificar a relação linear entre o momento e a energia (Molitor et al.). (a) Representação da estrutura cristalina do grafeno e a sua célula unitária com os respetivos vetores de rede e a distância interatômica; (b) representação da estrutura de bandas de energia do grafeno e os respetivos pontos de interceção das duas bandas de energia; (c) Destaque da interceção das estruturas de bandas nas proximidades dos pontos K, K' denominada por ponto de Dirac.	10
Figura 2.3 – Representação esquemática da interação da radiação com uma molécula e os diferentes tipos de mecanismos associados com os respetivos tempos de duração do acontecimento. Estão também representados os estados eletrónicos S_0, S_1 e S_2 e os respetivos estados vibracionais numerados.	14
Figura 2.4 – Ilustração do mecanismo de fluorescência. Na figura estão representados os modos vibracionais, com energia $\hbar\Omega_i$ dos estados eletrónicos, fundamental (E_0) e excitado (E_1), e as transições eletrónicas (Absorção e fluorescência) entre os modos vibracionais correspondentes ao máximo de sobreposição e a perda de energia E_{pi} devido a relaxação vibracional do estado excitado.	15
Figura 2.5 – Processo não linear da geração do segundo harmónico. O esquema representado ilustra a absorção simultânea de dois fótons (ω_p) através de dois estados virtuais e a respetiva emissão do fóton com o dobro da frequência ($2\omega_p$).	18
Figura 2.6 – Relação de dispersão das quasi-partículas plasmão-polaritão e plasmão-polaritão de superfície. Também está representada a dispersão da radiação eletromagnética no vazio e num meio com um índice de refração n , o que provoca uma atenuação na dispersão, essencial para a ativação do plasmão-polaritão de superfície. É possível verificar na figura o cruzamento das respetivas relações de dispersão.	22
Figura 2.7 – Ilustração do mecanismo FRET entre duas moléculas fluorescentes. A energia do estado excitado resultante da excitação por um pulso laser da espécie dadora é transferida, parcial ou total dependendo da distância que os separa (d), para espécie aceitadora pelo mecanismo FRET (seta preenchida a verde).	27
Figura 2.8 – Sobreposição dos espetros de emissão do dador e excitação do aceitador. A área de sobreposição (área a cinzento) é uma quantidade importante quando se efetua medições de FRET, sendo a característica que define a eficiência de transferência de energia pelo mecanismo.	28
Figura 2.9 – O efeito plasmónico na eficiência da fluorescência. O confinamento da radiação pela superfície plasmónica da nano partícula permite a excitação localizada e eficiente de espécies fluorescentes de baixo rendimento, levando a um aumento drástico na emissão fluorescente das mesmas.	31
Figura 2.10 – Esquema de uma placa detetora de multicanais. Nas extremidades dos multicanais, revestidos por um coating fotossensível, é aplicada uma alta voltagem que possibilita a formação de uma cascata de eletrões dentro do canal iniciada pelo fóton detetado.	39
Figura 2.11 – Arquitetura da placa B&H SPC-150 usada na aquisição experimental. Os fótons detetados, um por um, são agrupados num histograma em que cada coluna representa um canal temporal sendo a resolução do sistema de 20ps. O sinal proveniente da amostra (A) é processado por elementos eletrónicos de rápida execução (CFD,TAC,PGA) sendo convertido num sinal digital pelo elemento ADC para a posterior agrupação num histograma.	39
Figura 2.12 – Imagem FLIM de uma estrutura híbrida composta por uma amostra de grafeno e uma molécula fluorescente separados por 20 nm. A amostra de grafeno foi identificada por microscopia ótica (a). A respetiva imagem FLIM contém informação sobre a intensidade fluorescente (b) e os tempos de vida da espécie fluorescente, sendo possível efetuar uma contraste entre as duas informações (d). Cada pixel da imagem FLIM corresponde a um perfil de decaimento como esta presente na sub-figura (e) que corresponde ao pixel referente ao cursor representado em (b), (c) e (d).	42
Figura 3.1 - Segundo passo do processo de expansão das amostras de grafite. Depois de filtradas as amostras eram colocadas numa solução de álcool, que originavam uma reação isotérmica com as espécies de H_2SO_4 residuais e as espécie intercaladas de SO_3 originando complexos $EtOH \cdot SO_3$.	46
Figura 3.2 – Primeiro passo da intercalação de espécies químicas entre os planos de grafeno constituintes da grafite. Nestes passo espécies químicas de SO_3 são inseridas entre os planos.	46

Figura 3.3 – Teoria e experiência do método de aumento do contraste de grafeno por aproximação dos índices de reflexão do suporte e da objetiva. Na simulação (a) observam-se dois picos máximos para o contraste referentes aos dois regimes, negativo e positivo. Para a verificação experimental foi usado o esquema apresentado em (b). A experiência mostrou um aumento do contraste em comparação com o ar, assim como os dois regimes (c). Em (c), o perfil foi obtido no lado superior do retângulo azul presente na Figura 3.4 para todos os meios. Para o regime positivo foi usado ar, glicerol e óleo de imersão com um índice de refração 1,0, 1,47 e 1,48 respectivamente e para a observação do regime negativo foi usado quinolina com um índice de refração 1,62.	50
Figura 3.4 – Perfil da superfície da amostra de grafeno e da dupla camada de grafeno e o respectivo regime e aumento do contraste. Em (a) está a amostra usando o óleo de imersão como o meio e o respectivo perfil em (c). Em (b) está a amostra usando o líquido quinolina e o respectivo perfil em (d), através deste verifica-se a mudança de regime no contraste.	51
Figura 3.5 – Esquematização da técnica de spin-coating e as várias etapas importantes na deposição; (a) deposição da solução polimérica, (b) aceleração do suporte; (c) regime de homogeneização do filme efetuado a velocidade contante; (d) evaporação do solvente durante a homogeneização do filme, solventes com baixo ponto de ebulição representa uma melhor homogeneização.	52
Figura 3.6 – Resultado da deposição de uma camada ao longo de um substrato retangular de silício. Através da interferência ótica é possível verificar o padrão resultante da deposição por spin coating; uma zona homogênea no centro do substrato e um padrão ondulatório nas extremidades, resultado da deposição radial e das tensões superficiais oferecidas pela forma geométrica do substrato.	54
Figura 3.7 – Defeitos nas camadas depositadas por spin coating, visualizados através da microscopia FLIM. Estes, são resultado da rugosidade criada pela transferência do resultado da exfoliação mecânica para o substrato	55
Figura 3.8 – Esquema da estrutura híbrida idealizada para execução da experiência proposta. As amostras de grafeno foram depositadas num suporte de vidro sobre a qual foi depositado uma camada de espaçamento para o estudo da dependência da distância na inibição da fluorescência da espécie fluorescente imobilizada na camada dopada pelo grafeno.	57
Figura 3.9 – Estrutura da molécula fluorescente perylene.	58
Figura 3.10 - Espectro de excitação e emissão da molécula perylene quando imobilizada na camada de PMMA depositada sobre uma lamela de vidro.	58
Figura 3.11 – Confirmação da deposição das camadas constituintes das estruturas híbridas. A amostra de grafeno depositada no vidro (a) não permite a formação de micro bolhas devido a sua característica hidrofóbica (b). Após a deposição das camadas constituintes (c) é visível a formação das microbolhas na posição referente a amostra de grafeno (d). Isto confirma a deposição em conjunto com a homogeneidade das microbolhas observada sobre as camadas depositadas (Figura 3.17).	59
Figura 3.12 – Espectros de emissão de fluorescência da molécula perylene usada para dopar a respetiva camada. Pela análise dos espectros referentes a várias lamelas de vidro as quais foi aplicado uma camada dopada nas mesmas condições, concentração e velocidade, conclui-se que a técnica de spin coating é viável e reproduzível.	60
Figura 3.13 – Foto do instrumento pulse-picker e ilustração da sua função. A peça central do instrumento, cristal de sílica fundida, é usado para a seleção sincronizada de pulsos laser, através de um efeito foto-acústico, com o propósito de espaçar a distância temporal entre dois pulsos consecutivos.	64
Figura 3.14 – Foto do instrumento de geração de segundo harmónico e respetiva ilustração. O feixe pulsado constituído pela seleção de pulsos do feixe original, é convertido com alta eficiência por um cristal, num feixe pulsado com um comprimento de onda que é metade do original.	65
Figura 3.15 – Foto da montagem experimental do sistema FLIM e respetiva legenda. Composto por, uma objetiva com uma magnificação de 100x e uma abertura numérica de 0.7; um motor bidimensional XY que permite efetuar um varrimento da amostra de modo a obter uma imagem com os perfis de decaimentos em cada pixel. A aquisição é efetuada por um fotomultiplicador de multicanaís (MCP) Hamamatsu R3809U-51 que envia o sinal referente para uma placa B&H SPC-150 para a agrupação em histograma.	66
Figura 3.16 – No topo, da esquerda para a direita, sequência na identificação e referenciação de uma amostra de grafeno (Figura 3.11) pela microscopia FLIM. Em baixo imagem FLIM onde é possível verificar a inibição da fluorescência da molécula perylene à distância de 15 nm do grafeno.	67
Figura 3.17 – Imagem FLIM da amostra da figura 3.16 onde estão marcados os pontos selecionados e referenciados para a aquisição singular dos perfis de decaimento pela técnica TCSPC.	67
Figura 3.18 – Perfil experimental do decaimento da molécula perylene, adquiridos pela técnica TCSPC, nos pontos marcados na figura 3.17.	68

Figura 3.19 – A microscopia FLIM permite a visualização da amostra de grafeno (a) (visualização da amostra em microscópio ótico de reflexão) através da obtenção da imagem FLIM (b) através da qual eram selecionados pontos singulares para a obtenção singular de perfis de decaimento. Tirando uma nova imagem FLIM, após a aquisição dos perfis singulares (c), confirmava a posição da aquisição.	69
Figura 3.20 – Perfil experimental do decaimento da fluorescência da espécie perylene imobilizada na camada de PMMA (azul), ao qual foi efetuado um ajuste de duas exponenciais de acordo com a equação (3.15) (linha preta). Uma constante e baixa magnitude dos resíduos e um chi-quadrado reduzido perto da unidade indicam um ajuste adequado.	73
Figura 3.21 – Ajuste, mencionado na figura 3.20, e efetuado aos perfis experimentais de decaimento correspondentes as posições referenciadas na figura 3.17.	74
Figura 3.22 – Representação dos dados experimentais para o rendimento quântico do estado excitado da molécula perylene na presença do grafeno a várias distâncias.....	76
Figura 3.23 – Ajuste dos dados experimentais representados figura 3.22 através da expressão (3.19). Está também representada a teoria correspondente ao comprimento de onda 440 nm efetuada através da equação (2.19).	77

Acrónimos

PMMA - Poly(methyl 2-methylpropenoate)

FRET - *Förster resonance energy transfer*

FLIM – *Fluorescence lifetime imaging microscopy*

TCSPC - *Time-Correlated Single Photon Counting*

SPP – *Surface plasmon polariton*

CFD – *Constant-fraction discriminators*

TAC – *Time to amplitude Converter*

PGA – *Programmable gain amplifier*

ADC – *Analog digital converter*

THz – Frequências Terahertz

MCP – *Microchannel Plate*

Nd:YVO₄ - *Neodymium-doped yttrium orthovanadate*

Ti:sapfira – Titânio-safira

TBA – Base de Tetrabutilamônio

Índice

Capítulo 1	1
Introdução	1
Capítulo 2	5
Alótropos de Carbono	5
Grafeno	7
Grafeno Propriedades	9
Fluorescência	13
Ótica não-linear	17
Radiação e Plasmões	21
Plasmões no grafeno	25
FRET	27
Inibição da fluorescência pelo grafeno.	33
Espetroscopia TCSPC	37
Microscopia FLIM	41
Capítulo 3	45
Procedimento experimental	45
Amostras de grafeno	45
Visualização e identificação das amostras de grafeno.....	47
Spin Coating	51
Estruturas	57
Aquisição dos dados	63
Resultados e análise	71
Capítulo 4	79
Conclusões e Perspetivas	79
Bibliografia	81

Capítulo 1

Introdução

O elevado grau de complexidade dos sistemas biológicos torna a sua quantificação impossível. Todos os processos na Natureza são a soma de processos simples que, por seu lado, são resultado de reações elementares, resultantes também elas da interação de partículas fundamentais. Observar, compreender e quantificar os sistemas biológicos é uma tarefa que o Homem está empenhado em tentar complementar. Encontrar padrões no meio das suas imensas e complexas teias é uma tarefa árdua mas gratificante, pois permite ao Homem encontrar modelos para uma nova era tecnológica.

A procura de sistemas de produção de energias limpas e sustentáveis é um grande desafio que a humanidade está a enfrentar, e o Homem tenta encontrar na Natureza a resposta para a sua produção. Os sistemas fotossintéticos presentes nas plantas e em algumas bactérias representam um modelo natural da aquisição de energia solar de forma limpa e eficaz. Encontrar os mecanismos na base do funcionamento desse processo e a sua estrutura é essencial para a sua reprodução pelo Homem de forma artificial (Hildner et al.; Scholes et al.). Este exemplo realça a necessidade de entender a complexidade dos sistemas biológicos.

Contudo, a necessidade de entender os sistemas biológicos não tem só como finalidade a sua reprodução artificial pelo Homem, mas também a sua proteção. A atividade do Homem é uma ameaça para algumas espécies incluído a sua. Doenças e mutações são exemplos de ameaças permanentes que ele enfrenta. Encontrar meios para sua aniquilação ou controle é uma necessidade lógica e essencial para assegurar a sua

existência. As ameaças mencionadas são cada vez mais complexas o que implica encontrar métodos eficazes e específicos de combate (Liu et al.; Master, Livingston, and Sen Gupta; Sahu et al.). Na busca de novos métodos ou no aperfeiçoamento dos já conhecidos é crucial ter um profundo e detalhado conhecimento dos sistemas onde se pretende atuar. É necessário observar de uma forma direta ou indireta (Marcu and Hartl; Perry, Burke, and Brown; Weigert, Porat-Shliom, and Amornphimoltham). É necessário monitorizar, rotular, medir, quantificar e interagir. Tais atos necessitam de processos que os tornem exequíveis. Sensores são os mais comuns e usados mecanismos de tradução de sinais biológicos para um sinal possível de ser lido e entendido pelo ser humano. Existem em diversas formas e utilizam os mais variados meios de leitura e criação de sinais. A sua larga versatilidade e aplicabilidade torna-os num mecanismo de eleição para observação indireta de fenómenos que ocorrem a nível molecular. Novos Materiais são uma chave para ampliar sua aplicabilidade e exatidão.

Grafeno, visualizado pela primeira vez em 2004 (Novoselov, Geim, Morozov, Jiang, Zhang, et al.) pelos físicos Andre Geim e Konstantin Novoselov da Universidade de Manchester, Inglaterra, viu a sua investigação tornar-se viral desde então, tendo os dois pioneiros no seu estudo sido laureados com o premio Nobel da física em 2010. O grafeno é um alótropo de carbono de estrutura planar onde os átomos estão agrupados de forma hexagonal semelhante a um favo de mel. Com uma espessura de apenas um átomo de carbono, conduz a corrente elétrica 100 vezes mais eficientemente que o cobre e possui uma resistência à quebra muito superior à do aço, e no entanto, é um dos materiais mais flexíveis que se conhece (Geim and Novoselov).

Grafeno é alvo de investimento a larga escala por parte de países como a Inglaterra, Coreia do Sul, Singapura e da Comunidade Europeia, e de empresas multinacionais como a Nokia, Samsung, IBM ou BASF. Este investimento é estimulado pela sua aplicabilidade, o que leva também a designa-lo como material miraculoso do século XXI.

Os fenómenos biológicos têm como origem interações entre partículas fundamentais, o que corresponde a processos físicos. Estes desencadeiam uma cascata de outros processos. Interação, movimento de cargas, transferência de energia e dinâmica de fluidos, são exemplos de tais processos que originam fenómenos biológicos conhecidos.

A biofísica é, assim, uma área científica em expansão e com muito potencial para ajudar a compreender os sistemas biológicos.

Nesta dissertação tenciono demonstrar a utilidade do uso do grafeno como plataforma de exploração, monitorização e quantificação em processos biológicos complexos. Já foi demonstrado que o grafeno pode ser uma plataforma viável para a entrega controlada de fármacos (Yang et al.). A sua baixa toxicidade, flexibilidade e estrutura planar, que oferece uma larga área proveitosa, fornecem características únicas. Foi também demonstrado teoricamente que o grafeno tem um longo alcance na inibição da fluorescência (Gómez-Santos and Stauber) independente da sua origem e frequência, que em combinação com o seu espectro de absorção, constante ao longo de toda a gama do visível e infravermelho (Nair et al.), faz dele um material versátil para a monitorização de interações, da entrega de fármacos e para a medição de distâncias a nível nanométrico. A inibição da fluorescência pelo grafeno envolve o processo de transferência de energia por mecanismo não radiativo conhecido por, FRET (*Förster resonance energy transfer*), largamente usado em estudos biológicos. O FRET convencional, entre duas moléculas fluorescentes, possui uma janela de ação limitada a alguns nanómetros. Pelo contrário, a ocorrência de FRET entre uma espécie fluorescente e o grafeno tem, demonstrado teoricamente, uma janela de ação de dezenas de nanómetros, o que possibilita medições espaciais e monitorização de interações nesta janela. Como plano de trabalhos para esta dissertação de mestrado propôs-se verificar experimentalmente esta janela de ação de inibição da fluorescência pelo grafeno. A tarefa proposta foi concluída com sucesso.

A inibição a grandes distâncias pelo grafeno está associada a decaimentos transversos ao vetor da onda propagante. Em geral, estes decaimentos são quase inteiramente resultado de plasmões transversos. Grafeno puro não suporta plasmões, pois não há conservação do momento. Para a sua ativação é necessário dopar a amostra de grafeno, por padronização da sua superfície ou por aplicação de um campo elétrico. Deste modo a inibição da fluorescência por estas amostras, pode ser usada como técnica de deteção e caracterização de plasmões em grafeno (Gómez-Santos and Stauber).

Uma rápida e viável caracterização é essencial para futuras aplicações.

Capítulo 2

Alótropos de Carbono

Carbono é um elemento essencial para a origem da vida tal como a conhecemos na Terra. É o elemento mais versátil da tabela periódica e representa-se pelo símbolo **C**. A estrutura eletrônica de um átomo de carbono isolado é $(1s)^2(2s)^2(2p)^2$. Quando está agrupado numa estrutura sólida os elétrons correspondentes a $(1s)$ permanecem inertes, mas os que correspondem a $(2s)$ e $(2p)$, na maior parte dos casos, hibridizam formando orbitais sp^3 o que corresponde a ligações tetraédricas, ocupando todos os elétrons de valência (elétrons da última camada ocupada). Isto é o que acontece para o caso do diamante, um dos alótropos conhecidos do carbono. Outra possível alternativa de hibridização é em orbitais sp^2 , o que corresponde a um arranjo planar dos átomos, com um ângulo de 120° entre si, formando uma rede hexagonal, como é o caso da grafite, nanotubos de carbono e grafeno.

A versatilidade do elemento carbono permite que existam uma quantidade enorme de alótropos deste elemento. Entende-se por alotropia a capacidade de um elemento formar compostos com arranjos dos átomos da sua estrutura molecular diferentes, que consequentemente, conferem propriedades diferentes a esses compostos. No caso do carbono, os alótropos mais conhecidos são a grafite e o diamante, no entanto, não são os únicos. Fazem igualmente parte desta categoria o grafeno, nanotubos de carbono, fulereno, nanocones de carbono, nanobarras de carbono, nanoespuma de carbono,

nanodiamantes, pontos quânticos de carbono, lonsdaleíta¹, acetileno linear de carbono², vidro de carbono e carbono amorfo. Estudos recentes demonstram que alótropos mais radicais de carbono são “possíveis” de existir ou de formar (Sheng et al.).

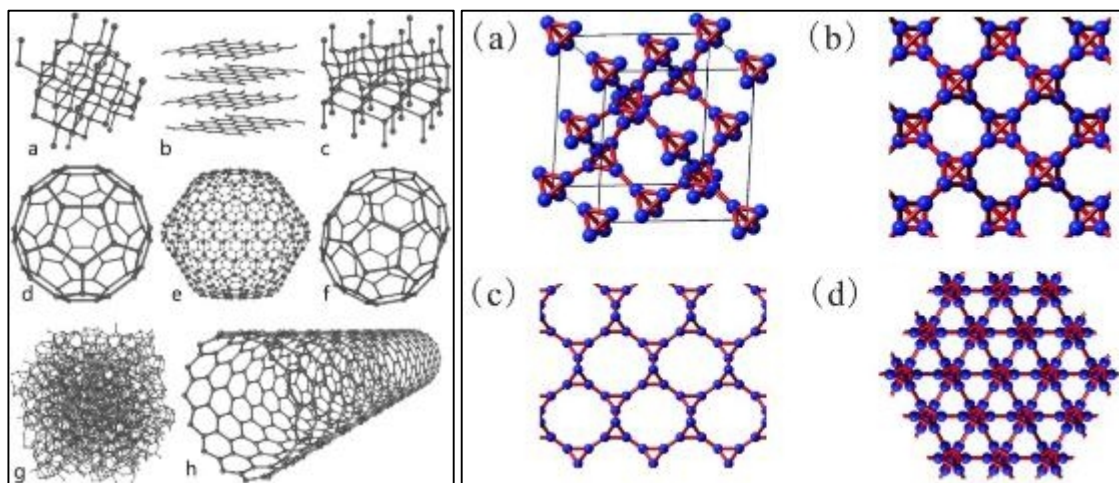


Figura 2.1 - As diferentes estruturas dos alótropos de carbono. À direita, alguns alótropos conhecidos e visualizados. À esquerda, algumas estruturas de alótropos de carbono possíveis de existir ou produzir (Sheng et al.).

¹ Polimorfo hexagonal de carbono encontrado em crateras de meteoritos, assim chamado em homenagem a Kathleen Lonsdale.

² Linear acetylenic carbon (Carbyne)

Grafeno

Philip Russell Wallace em 1947 (Wallace) publicou o primeiro estudo teórico sobre as propriedades eletrônicas do grafeno. No seu artigo com o título "*The Band Structure of Graphite*", publicado na revista *Physical Review* ele calculou a estrutura de bandas do elemento mais fino de grafite um único plano de átomos de carbono ordenados numa forma hexagonal, em que cada vértice do hexágono corresponde à posição de um átomo de carbono. Cada átomo está ligado a três átomos vizinhos através de ligações híbridas sp^2 , o que lhe concede a estrutura plana. Os átomos de carbono possuem quatro elétrons na última camada ocupada (camada de valência), o que lhe permite formar até quatro ligações químicas, mas, no caso do grafeno, um elétron fica livre por cada átomo de carbono, o que lhe concede propriedades únicas. Philip Russell Wallace no seu artigo descreveu este elemento finíssimo de grafite como sendo um semiconductor com energia de ativação zero, ou seja, não possui o hiato de energia característica próprio dos semicondutores, e demonstrou ter uma elevada condutividade elétrica. Este finíssimo plano de grafite foi batizado de grafeno pela primeira vez na década de oitenta.

Grafeno é descrito como um material bidimensional onde a sua altura de apenas de um átomo de carbono, é desprezível, considera-se assim, igual a zero na sua descrição teórica. Nas décadas precedentes ao seu primeiro estudo teórico ele foi alvo de uma elevada investigação teórica, e nos finais da década de sessenta Landau, Peierls e Mermin (Geim and Novoselov) afirmaram e demonstraram que materiais bidimensionais não podem existir naturalmente, porque são termodinamicamente instáveis. Contudo, os estudos teóricos continuaram a surgir, por exemplo, Eduardo Frankin demonstrou no seu artigo em 1986 que o grafeno oferece pouca resistência à corrente elétrica. Apesar de o grafeno apresentar propriedades promissoras, já no seu primeiro estudo teórico, as características termodinamicamente desfavoráveis impediam a sua produção, apesar dos vários esforços para a conseguir. Termodinamicamente instável não implica ser impossível de existir, significa não poder existir na posição mínima de energia, mas pode existir numa

posição metastável, posição de equilíbrio com energia superior a posição mínima³, e na realidade grafeno existe. Este foi observado pela primeira vez em 2004 por Andre Geim e Konstantin Novoselov (Novoselov, Geim, Morozov, Jiang, Zhang, et al.), ambos investigadores da Universidade de Manchester, Inglaterra. Com a sua descoberta as primeiras medidas experimentais foram efetuadas pelos mesmos investigadores. No seu artigo original com o título de *“Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films”*, verificaram experimentalmente uma alta mobilidade eletrónica induzida pela aplicação de um campo elétrico. Esta experiência “de sexta-feira à noite⁴” excitou a imaginação de investigadores por todo o mundo. Com a sua descoberta a barreira termodinâmica foi ignorada e novos materiais bidimensionais foram surgindo com as mais diversas características: isoladores, condutores, e semicondutores com hiato de energia (Butler et al.; Novoselov, Jiang, et al.). Através da sobreposição e combinação destes novos materiais bidimensionais em junção com o grafeno é possível construir-se estruturas híbridas com as mais diversas propriedades (Novoselov, Castro Neto, and Neto). Por exemplo, ao empilhar o grafeno entre duas camadas de nitreto de boro aumenta-se a mobilidade eletrónica no grafeno (Dean et al.).

A descoberta do grafeno, a observação e o seu estudo pioneiro abriu portas e quebrou barreiras, iniciou uma nova era na física, na eletrónica, na ótica, na biologia e na indústria. Este contributo foi premiado com a entrega do prémio Nobel da Física em 2010 aos investigadores Andre Geim e Konstantin Novoselov.

³ Para mais informações consultar as apresentações de A. Geim e K. S. Novoselov referentes a entrega do prémio Nobel, http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/2010/

⁴ Ver, <http://www.graphene.manchester.ac.uk/story/>

Grafeno Propriedades

O grafeno possui uma estrutura cristalina em forma hexagonal o que lhe confere uma extraordinária estrutura de bandas. Cada átomo de carbono está ligado a três átomos de carbono vizinhos através de ligações σ , o que corresponde à partilha de um par de elétrons, e estão orientadas segundo o plano $x-y$. O carbono possui quatro elétrons na última camada ocupada o que lhe permite efetuar quatro ligações químicas. No grafeno, a quarta ligação é do tipo π e está orientada na direção z (altura). Esta ligação confere-lhe um par simétrico de orbitais nesta direção, centradas no átomo de carbono correspondente, e prolongando-se simetricamente para fora do plano estrutural ($x-y$). Cada átomo possui um destes pares de orbitais, que entre eles formam respetivamente as bandas π e π^* , responsáveis pelas peculiares propriedades do grafeno.

A célula unitária da estrutura hexagonal do grafeno pode ser vista como o entrelaçamento de dois triângulos, esta foi a aproximação usada por Wallace em 1947. A distância entre dois átomos de carbono vizinhos (a) é de 1.42 \AA e usando o método *tight-binding*, tendo em conta os vizinhos mais próximos, obtemos a estrutura de bandas do grafeno, que oferece a relação entre a energia e o momento dos elétrons no grafeno. Uma abordagem mais simples consiste em interpretar a rede cristalina do grafeno como o produto de duas sub-redes compostas, unicamente e independente, por elementos A e elementos B, sendo a célula unitária composta por um elemento A e B e corresponde a região cinzenta na figura 2.2 (a). O Hamiltoniano, operador quântico de energia, para esta abordagem é dado por,

$$\hat{H} = \begin{pmatrix} E_A & t(1 + e^{i\vec{k} \cdot \vec{a}_1} + e^{i\vec{k} \cdot \vec{a}_2}) \\ t(1 + e^{-i\vec{k} \cdot \vec{a}_1} + te^{-i\vec{k} \cdot \vec{a}_2}) & E_B \end{pmatrix} \quad (2.1)$$

sendo as energias locais dos respetivos átomos de carbono (E_A, E_B) nulas, $t \approx 2.7 \text{ eV}$ e corresponde ao parâmetro de salto e indica a facilidade com que um elétron pode saltar entre as orbitais (Castro Neto et al.). Os vetores \vec{a}_1 e \vec{a}_2 representam os vetores da rede, sendo $\vec{a}_1 = a/2(\sqrt{3}, 1)$ e $\vec{a}_2 = a/2(\sqrt{3}, -1)$. Calculando os valores próprios do

hamiltoniano do sistema (2.1), que correspondem aos valores próprios de energia do sistema em função do vetor de onda $\vec{k} = (k_x, k_y)$, obtemos a estrutura de bandas do grafeno, representada na figura 2.2.

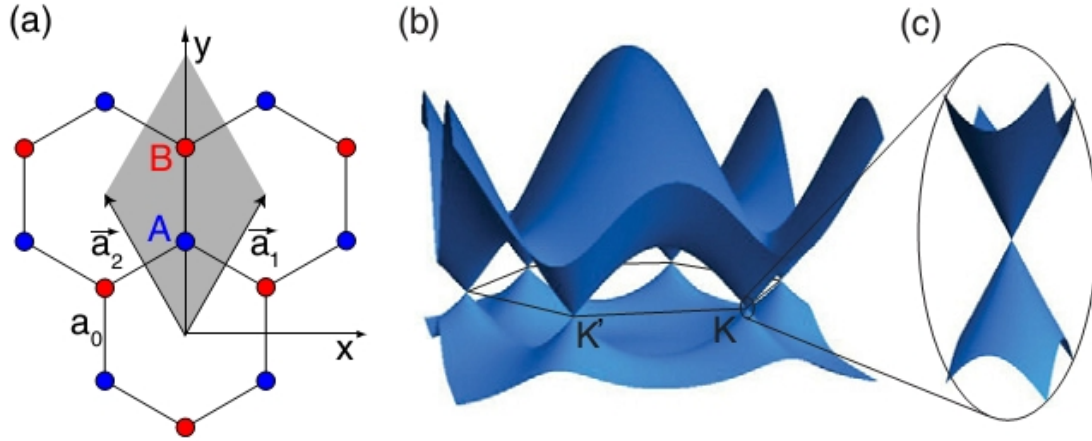


Figura 2.2 – Estrutura cristalina do grafeno e a sua estrutura de bandas onde é possível verificar a relação linear entre o momento e a energia (Molitor et al.). (a) Representação da estrutura cristalina do grafeno e a sua célula unitária com os respetivos vetores de rede e a distância interatômica; (b) representação da estrutura de bandas de energia do grafeno e os respetivos pontos de interceção das duas bandas de energia; (c) Destaque da interceção das estruturas de bandas nas proximidades dos pontos K, K' denominada por ponto de Dirac.

Os valores próprios da energias são,

$$E_{\pm}(k) = \pm t \sqrt{3 + f(k)} \quad (2.2)$$

onde,

$$f(k) = 2 \cos(\sqrt{3}k_y a) + 4 \cos\left(\frac{\sqrt{3}}{2}k_y a\right) \cos\left(\frac{3}{2}k_x a\right) \quad (2.3)$$

estes valores da energia corresponde as bandas π e π^* que são simétricas para baixas energias (figura 2.2) e possui uma relação linear perto dos pontos K e K' , o que permite efetuar uma aproximação do tipo,

$$E_{\pm}(k) \approx \pm \hbar v_F |k - K| \quad (2.4)$$

Esta relação linear de dispersão é bem descrita pela equação de Dirac para partículas sem massa, que para este caso, em vez da velocidade da luz é usada a velocidade de Fermi

(v_F), que é aproximadamente $v_F \approx 10^6 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$. Isto implica que os elétrons no grafeno comportam-se como se não tivessem massa. Para esta aproximação o hamiltoniano é,

$$\hat{H}_K = \hbar v_F \begin{pmatrix} 0 & k_x - ik_y \\ k_x + ik_y & 0 \end{pmatrix} = \hbar v_F \vec{\sigma} \cdot \vec{k} \quad (2.5)$$

e corresponde ao hamiltoniano representado na equação (2.1), expandido para as redondezas do ponto K , onde $\vec{\sigma} = (\sigma_x, \sigma_y)$ representam as matrizes de Pauli para duas dimensões (2D). Este comportamento dos elétrons, mais corretamente, dos transportadores de carga (elétrons e lacunas) (Peres), é um dos aspetos mais intrigantes do grafeno e é responsável por toda a atenção dada pelos investigadores após a sua observação experimental que ocorreu no ano de 2005 no seio do grupo dos investigadores Geim e Novoselov, quando observaram experimentalmente efeito de Hall fracionário numa amostra pura de grafeno suspenso (Novoselov, Geim, Morozov, Jiang, Katsnelson, et al.). Verificaram também que o grafeno possui um mínimo de condutividade com magnitude de $\pi e^2/2h$, (e -carga do elétron, h - constante de Planck) que é independente dos parâmetros do material.

Em resumo, grafeno possui uma alta mobilidade eletrónica, os elétrons possuem um longo livre percurso médio e os coeficientes de Hall são fracionário. A sua transmissão ótica é constante em toda a região do visível e infravermelho e é definida apenas por constantes fundamentais $\pi\alpha \approx 2.3\%$ (π - número Pi, α - constante de estrutura fina) (Nair et al.). Propriedade muito promissora para aplicações onde requeiram condutores transparentes. As suas propriedades mecânicas, óticas e eletrónicas, que foram sendo descobertas ao longo da sua investigação, e mais recentemente propriedades plasmónicas (Grigorenko, Polini, and Novoselov; Pile) tornam o grafeno não só interessante do ponto de vista da física fundamental mas também para futuras aplicações.

Fluorescência

No início do século passado foram efetuadas várias experiências pioneiras que revolucionaram a compreensão da matéria. Estas levaram a várias e novas informações sobre a matéria. Ela mostrou-se uma identidade dinâmica com uma característica dual, onda-partícula como a radiação, e a sua energia interna seja de um átomo, molécula ou um aglomerado molecular, até um determinado tamanho, possui um espectro discreto. A sua descrição é probabilística, sendo impossível determinar com grande precisão a posição e o momento de uma partícula num determinado instante de tempo. Este último conceito é conhecido por princípio de incerteza de Heisenberg, em homenagem ao físico alemão Werner Karl Heisenberg. A característica dual da matéria afirma que cada elemento de matéria possui um comprimento de onda associado, conhecida por comprimento de onda de Broglie em homenagem ao físico francês Louis de Broglie, sendo possível associar ao seu momento a esse comprimento de onda. Estes novos termos são a base da descrição quântica da matéria. Postulou-se que as todas as grandezas físicas (energia, momento, momento angular, etc) associadas à matéria têm uma natureza discreta e probabilística.

A radiação eletromagnética é absorvida e emitida pela matéria sobre a forma de um fóton. No entanto, a emissão sobre a forma de radiação, fótons, não é a única forma de transferência de energia. A transferência de energia por mecanismos não radiativos também é permitida, por exemplo por colisões e transferências de cargas elétricas. Fluorescência é um mecanismo de emissão por radiação. Para o descrever é necessário recorrer à natureza discreta do espectro eletrônico da matéria.

De acordo com a teoria quântica, a energia interna de um átomo ou molécula possui um espectro discreto composto por níveis de energia bem definidos que dependem da sua estrutura e composição. Assim para promover um elétron no estado fundamental, o último nível de energia ocupado (E_0), para um enésimo estado excitado correspondente a um nível de energia superior (E_i), é necessário fornecer uma energia igual à sua diferença de energias (ΔE).

$$\Delta E = E_i - E_0 = \frac{hc}{\lambda} \quad (2.6)$$

Os estados de energia possuem várias características quânticas associadas como o número do nível (n), momento angular (ℓ), projeção do momento angular (m_ℓ) e projeção do spin do eletrão (m_s), e cada uma tem um número quântico associado, sendo o seu conjunto a definição de estado quântico.

O tempo decorrido entre a absorção e emissão de um fóton é da ordem dos 0,2 a 1000 nanosegundos, ver figura 2.3, sendo que o fóton emitido possui um comprimento de onda maior que o absorvido no caso das moléculas. Para o caso de um átomo isolado, o fóton emitido possui o mesmo comprimento de onda, na verdade, o fóton emitido também

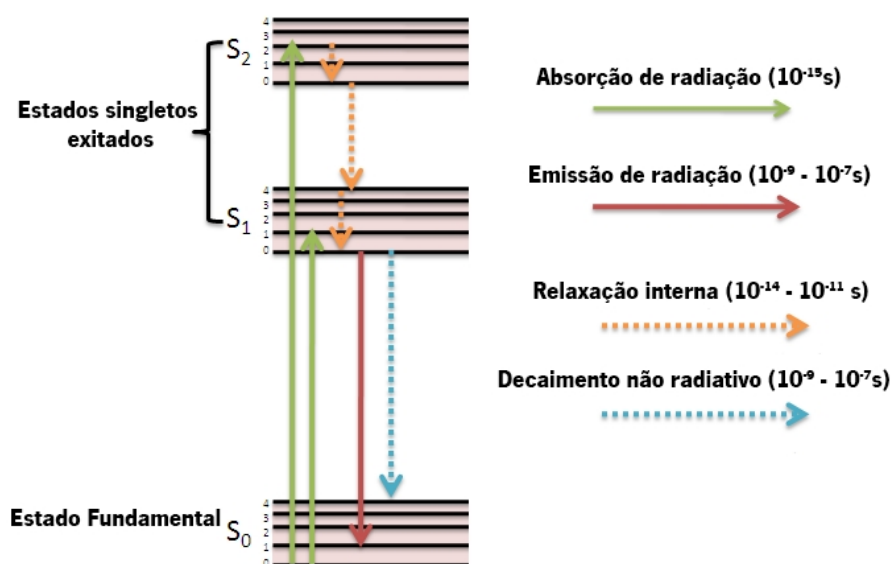


Figura 2.3 – Representação esquemática da interação da radiação com uma molécula e os diferentes tipos de mecanismos associados com os respectivos tempos de duração do acontecimento. Estão também representados os estados eletrônicos S_0 , S_1 e S_2 e os respectivos estados vibracionais numerados.

possui um desvio devido, ao efeito de doppler e alargamento espectral devido a interação com o meio, no entanto o desvio é mínimo sendo muitas vezes ignorado. A perda de energia, verificada na emissão pelas moléculas, está associada aos diferentes acoplamentos dos modos de vibração do eletrão no estado fundamental e no estado excitado, dentro do potencial interno, envolvidos na transição eletrónica, ver figura 2.4. O princípio de Franck–Condon assegura que as transições eletrónicas são efetuadas sem

que haja movimento do núcleo, deste modo, elas são puramente verticais. Deste modo as transições dipolares são proporcionais a sobreposição dos modos de vibração do eletrão, no estado fundamental e no estado excitado, dentro do potencial. Por outras palavras, a probabilidade de transição é calculada pela sobreposição das funções de onda dos estados vibracional no estado fundamental e no estado excitado. A transição pode ocorrer para estados vibracionais superiores ao seu mínimo, mas rapidamente, $\approx 1ps$, relaxa para o nível mínimo de vibração do respetivo nível atómico, ver figura 2.4. Esta relaxação inverte

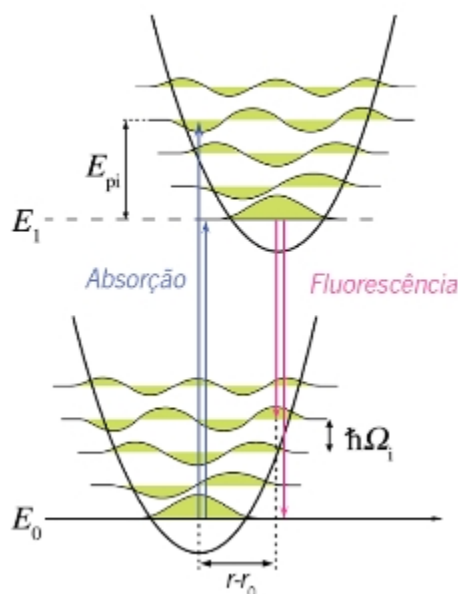


Figura 2.4 – Ilustração do mecanismo de fluorescência. Na figura estão representados os modos vibracionais, com energia $\hbar\Omega_i$ dos estados eletrónicos, fundamental (E_0) e excitado (E_1), e as transições eletrónicas (Absorção e fluorescência) entre os modos vibracionais correspondentes ao máximo de sobreposição e a perda de energia E_{pi} devido a relaxação vibracional do estado excitado.

os modos de sobreposição envolvidos na transição inicial e consequentemente, a transição para o estado eletrónico fundamental é diferenciada da transição de excitação. Este princípio assegura a origem da imagem espelhada entre o perfil do espectro da absorção e o da emissão, ver figura 3.10.

Quando um eletrão é promovido para um estado excitado, a configuração mínima de energia do elemento altera-se. No caso da fluorescência o estado excitado possui um tempo demasiado longo, daí a necessidade de o elemento se reajustar a nova configuração atómica, contudo, a resposta nuclear à alteração ocorrida é lenta devido a diferença entre

a sua massa e a do elétron. O elemento reage de diferentes maneiras, com o meio envolvente, de acordo com as diferentes configurações mínimas de energia, o que origina um desvio espectral entre os máximos da emissão e excitação. Este desvio é conhecido por desvio de Stokes em homenagem ao físico George G. Stokes, ver figura 3.10.

O processo de fluorescência é muito usado em investigação biológica. É uma forma direta e indireta de observar e estudar estes sistemas. Espécies fluorescentes existem numa larga gama espectral e com as mais variadas características, como tempo de decaimento, rendimento quântico, e com diferentes suscetibilidade ao pH, viscosidade e polaridade, assim a escolha destas, depende do tipo de informação que se pretende extrair do sistema.

Ótica não-linear

A Radiação eletromagnética ao se propagar num determinado meio sujeita os elétrons de valência a uma força. Esta força é normalmente pouco intensa e, em meios lineares e isotrópicos, a polarização (P) resultante é paralela e diretamente proporcional ao campo aplicado (E). Podendo, assim, definir-se a polarização resultante através equação (2.7),

$$P = \varepsilon_0 \chi E \quad (2.7)$$

Sendo ε_0 a permissividade do vácuo e χ a suscetibilidade elétrica do material. Esta representa a facilidade de polarização da radiação e está relacionada com a permissividade relativa do material (ε_r) e com o índice de refração do mesmo (n) através da relação (2.8)

$$n^2 = \varepsilon_r = 1 + \chi \quad (2.8)$$

Para campos elétricos intensos a relação entre a polarização do material e a amplitude do campo deixa ser linear como na equação (2.7). Se a polarização do campo incidente for coincidente com um dos eixos óticos principais do material a expressão pode ser generalizado através de uma serie de Taylor.

$$P = \varepsilon_0 (\chi E + \chi_2 E^2 + \chi_3 E^3 \dots) \quad (2.9)$$

Onde os coeficientes χ_i (com $i \geq 2$) representam as suscetibilidades não lineares do material e dão origem a uma resposta que varia com a intensidade do campo aplicado.

Representando de forma simples um campo elétrico associado a uma dada frequência ω , (expressão (2.10))

$$E = E_0 \sin(\omega t) \quad (2.10)$$

Que ao se propagar por um meio, a polarização resultante toma a forma,

$$P = \varepsilon_0 \left(\chi E_0 \sin(\omega t) + \chi_2 E_0 \sin^2(\omega t) + \chi_3 E_0 \sin^3(\omega t) \dots \right) \quad (2.11)$$

Podemos rescrever a equação (2.11) usando a identidade, $\sin^2(x) = \frac{1}{2}(1 - \cos(2x))$

$$P = \varepsilon_0 \left(\chi E_0 \sin(\omega t) + \frac{\chi_2 E_0^2}{2} (1 - \cos(2\omega t)) \dots \right) \quad (2.12)$$

O termo $\cos(2\omega t)$ na equação (2.12) representa a variação da polarização resultante com o dobro da frequência incidente. Ao incidir um feixe laser intenso num material com estas características é possível adquirir uma frequência com o dobro da frequência incidente. Este efeito não linear é conhecido como a geração do segundo harmónico (SGH) e para ocorrer é necessário que dois fotões seja simultaneamente absorvidos, através de um ou dois estados virtuais, ver figura 2.5, o que exige uma elevada correlação espacial e temporal entre eles.

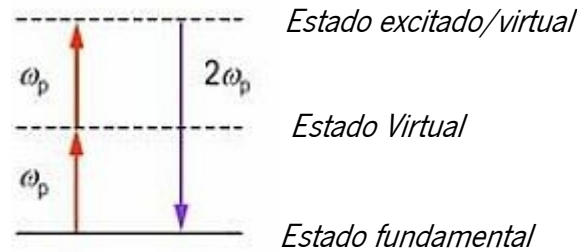


Figura 2.5 – Processo não linear da geração do segundo harmónico. O esquema representado ilustra a absorção simultânea de dois fotões (ω_p) através de dois estados virtuais e a respetiva emissão do fóton com o dobro da frequência ($2\omega_b$).

O uso de laser pulsados aumenta drasticamente a eficiência de efeitos não lineares devido a sua elevada correlação temporal e espacial. Tome-se o exemplo do sistema laser pulsado usado na realização desta experiência, com uma taxa de repetição de 76MHz , uma duração temporal de 100 femtosegundos (fs) e uma potência média de 730 mili-watts (mW), o que corresponde a uma potência por pulso de,

$$\frac{P}{76\text{MHz}} = 9,6 \times 10^{-9} \left(\frac{\text{W}}{100 \times 10^{-15} \text{s}} \right)$$

que equivaleria a uma potência de $9,6\text{MW}$ para um feixe contínuo. A potência sentida por um material exposto a um feixe laser é definida pela energia do feixe (E) durante um segundo de exposição. Desta forma a intensidade da radiação sentida pelo material através de um pulso laser é equivalente a um feixe laser contínuo com uma energia de,

$$E = t \times P \approx 9,6 \times 10^6 J$$

O uso de um feixe laser pulsado leva a uma boa eficiência na geração de efeitos não lineares como a geração do segundo harmônico, efeito não linear associado ao coeficiente χ_2 . A este coeficiente está também associado a absorção de dois fótons, propriedade que quase todas as moléculas fluorescentes possuem. Através deste efeito é possível excitar uma molécula com um comprimento superior ao comprimento de excitação por um único fóton, o que traz imensas vantagens, como por exemplo a diminuição drástica do ruído (*scattering*) e uma localização mais precisa da origem da fluorescência. A auto focagem (*Kerr-effect*) é um efeito não linear associado ao coeficiente χ_3 , e é usado como meio de ativação *mode-locking* em lasers pulsados.

Radiação e Plasmões

Plasmões representam oscilações elementares e discretas (*quantum*) dos elétrons num sólido metálico ou num plasma em resposta a um campo eletromagnético. Possuem um papel fundamental na resposta dinâmica do sistema e representam a base de investigação na ótica dos metamateriais, por exemplo. Em termos de mecânica quântica plasmões são quasi-partículas bosónicas, e como qualquer partícula, transportam energia e momento, e possuem spin inteiro ou zero.

Qualquer estrutura metálica quando sujeita a um campo eletromagnético produz quanta de oscilações, plasmões, que podem ser excitados ou acoplados a outras partículas ou quasi-partículas originando uma nova quasi-partícula. Quando o acoplamento é efetuado com fótons, o resultando é uma nova quasi-partícula chamada de plasmão-polaritão. Estes quanta de oscilação quando se propagam pela superfície do metal dá origem a um plasmão-polaritão de superfície, do inglês, *surface plasmon polariton (SPP)*, uma nova quasi-partícula. A sua propagação na superfície metálica tem um perfil evanescente devido ao seu confinamento vertical, sendo impossível excitar por via de radiação eletromagnética. Como é possível ver na figura 2.6, a sua relação de dispersão não possui pontos de intersecção com a dispersão da radiação eletromagnética no vácuo, mas quando se propaga num meio, a sua dispersão depende diretamente índice de refração (n), sendo possível atenuar a sua dispersão de modo a poder excitar SPP's em superfícies metálicas⁵, ver figura 2.6.

⁵ Para mais informações consultar o livro 2 e 3 da bibliografia.

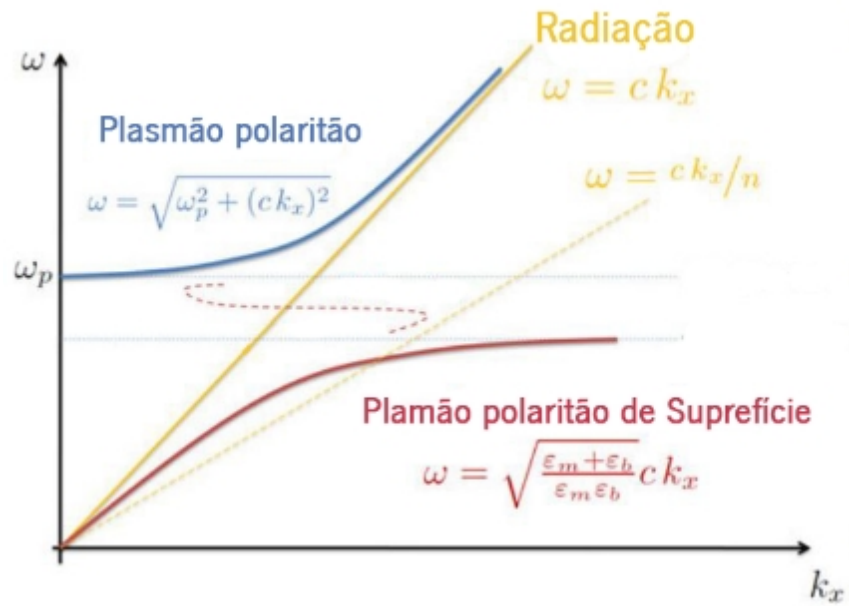


Figura 2.6 – Relação de dispersão das quasi-partículas plasmão-polaritão e plasmão-polaritão de superfície. Também está representada a dispersão da radiação eletromagnética no vácuo e num meio com um índice de refração n , o que provoca uma atenuação na dispersão, essencial para a ativação do plasmão-polaritão de superfície. É possível verificar na figura o cruzamento das respectivas relações de dispersão.

A forma mais comum de excitar SPP's, consiste em criar uma interface metal-dielétrica. Assim quando se ilumina a interface entre uma estrutura metálica e um dielétrico, as oscilações dos eletrões são afetadas pela presença do último, impedindo-os de o atravessar, e obrigando-os a moverem-se sobre a forma de onda com um perfil evanescente ao longo da interface metal-dielétrica.

Uma estrutura metálica de tamanho inferior ao comprimento de onda da radiação, possui a capacidade de confinar a energia da radiação em áreas nanométricas através de plasmões permitindo ultrapassar o limite de difração da radiação, que teoricamente corresponde a metade do comprimento de onda da mesma, o que abre portas a uma série de aplicações na área da optoelectrónica e nano lasers (Sorger and Zhang; Ma et al.; Oulton). Funcionam também como fonte de radiação altamente localizada, permitindo excitação localizada a escala nanométrica o que promove um aumento da eficácia de muitos processos óticos dependentes de fatores de qualidade como é o caso do sinal

Raman (Stiles et al.; Huh, Chung, and Erickson), fluorescência de espécies de baixo rendimento quântico (Schuller et al.) e processos óticos não lineares (Hajisalem et al.). Permite também efetuar uma seleção em termos singulares, possibilitando a contagem singular de moléculas. A fotomedicina é uma área de investigação em ascensão e explora esta propriedade como meio de aniquilação selecionada de células tumorais (Aslan, Lakowicz, and Geddes).

Os *SPP* também existem em nanopartículas metálicas, onde a sua forma e tamanho define as propriedades destas oscilações, e em conjunto com filmes finos metálicos representam a base do novo ramo de investigação *Plasmonics*, ramo científico responsável pelos estudos de fenómenos associados aos plasmões. No entanto, os metais têm uma alta perda de energia devido ao efeito de joule e oferecem uma elevada resistência à alteração das propriedades plasmónicas, o que limita a sua aplicabilidade. Uma forma de contornar este obstáculo é usar novos materiais plasmónicos. Metamateriais são um campo de investigação em expansão que fornece e explora novos tipos de materiais com propriedade elétricas, óticas e plasmónicas diferentes das que se encontra na natureza, e, em alguns casos, exóticas. Outros materiais com grande potencial são os denominados por bidimensionais (2D), como é o caso do grafeno. Ele oferece uma nova perspetiva em termos plasmónicos sendo possível excita-los com frequências do infravermelho e Terahertz (THz).

Plasmões no grafeno

Plasmões de superfícies (SP's), oscilações dos transportadores de carga, no grafeno chamaram recentemente à atenção tanto experimentalmente como para novas perspectivas tecnológicas. Devido à sua dispersão linear, plasmões no grafeno são identidade puramente quânticas (Das Sarma and Li). Os SP's apenas existem em amostras de grafeno dopadas, seja por espécies químicas, padronização da superfície ou pela aplicação de um campo elétrico, sendo o seu confinamento mais forte que nos metais nobres (Koppens et al.). Como acontece com os plasmões de superfície nos metais nobres, no grafeno também se podem acoplar a fótons, elétrons ou fônons levando a criação de novas quasi-partículas. Este acoplamento ao ocorrer com fótons criam os SPP's, que no grafeno podem se excitar com frequências no infravermelho e em Terahertz (THz), o que fornece uma nova perspectiva em termos plasmônicos. Em semelhança com o resto das propriedades do grafeno, as propriedades plasmônicas também são manipuláveis, a quantidade de dopante, a forma da padronização ou a magnitude do campo elétrico definem a sua resposta plasmônica, o que traz imensas vantagens em comparação com os metais nobres.

Uma das aplicações mais mencionadas na literatura é sensores para radiação THz, uma gama de energia pouco explorada. Para a base destes, é necessário cobrir uma plataforma microestruturada com uma camada de grafeno (Peres et al.), ou empilhar nanodiscos de grafeno sobre um dielétrico de modo a criar uma estrutura padronizada (Yan et al.). Em ambas as abordagens as características do sensor são afinadas através da alteração dos parâmetros da estrutura. Outra aplicação que explora os SPPs no grafeno, consiste em padronizar a sua superfície através nanopartículas metálicas, o que permite alcançar propriedades como absorção total da radiação (Koppens et al.), e, conseqüente aumento da foto-corrente no grafeno, o poderá servir de base para as novas células fotovoltaicas.

Em suma, excitações discretas do plasma em sistemas governados pela equação de Dirac como é o caso do grafeno, são uma propriedade promissora para aplicações futuras. Tais sistemas possuem uma resposta plasmônica cerca de 10 vezes mais intensa

que nos metais nobres como o ouro e a prata, e existem com as mais diversas características óticas: dielétricos semicondutores, semi-metálicos, sem hiato e com hiato de energia pequeno ou grande. Estas interações podem também contribuir para novas descobertas na física fundamental.

FRET

A matéria possui um espectro eletrônico discreto, o que significa que apenas fótons com energia igual ou superior a diferença de energias dos estados excitado e fundamental promovem o elétron para o estado excitado, regressando ao estado fundamental ao fim de um determinado tempo. A relaxação pode ocorrer por dois mecanismos principais, radiativo ou não radiativo. O radiativo envolve emissão de um fóton tipicamente com uma energia. No caso não radiativo, não há emissão de fóton sendo a transferência de energia feita por processos como colisões com o meio envolvente, espécies vizinhas ou através de transferências de cargas ou energia entre duas espécies ou meio.

Transferência de energia por ressonância de Förster (FRET), nome dado em homenagem ao físico alemão Theodor Förster o primeiro a observar e a estudar este mecanismo de transferência de energia, é um mecanismo de transferência de energia não radiativo que pode ocorrer entre elementos da mesma espécie fluorescente designado por

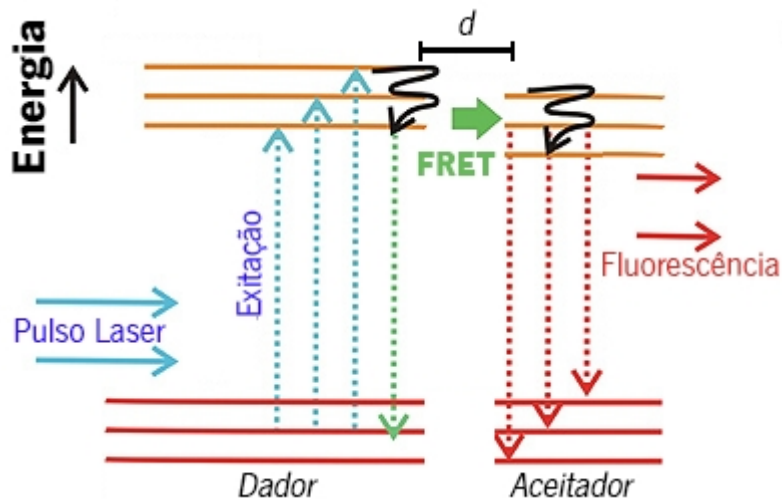


Figura 2.7 – Ilustração do mecanismo FRET entre duas moléculas fluorescentes. A energia do estado excitado resultante da excitação por um pulso laser da espécie dadora é transferida, parcial ou total dependendo da distância que os separa (d), para espécie aceitadora pelo mecanismo FRET (seta preenchida a verde).

HomoFRET, ou elementos de espécie diferentes, HeteroFRET. Usualmente quando se menciona o mecanismo de FRET está-se a referir a HeteroFRET. Este processo é usado

frequentemente em estudos biológicos onde é designado por transferência de energia de ressonância de fluorescência, por ser usado entre dois elementos fluorescentes, induzindo em erro, pois não é necessário ser entre espécies fluorescentes.

Para que a transferência de energia pelo mecanismo de FRET (Figura 2.7) ocorra é necessário que os espectros absorção do aceitador, elemento no estado fundamental, e o espectro de emissão do dador, elemento no estado excitado, se sobreponham completamente ou parcialmente, ver figura 2.8.



Figura 2.8 – Sobreposição dos espectros de emissão do dador e excitação do aceitador. A área de sobreposição (área a cinzento) é uma quantidade importante quando se efetua medições de FRET, sendo a característica que define a eficiência de transferência de energia pelo mecanismo.

FRET é uma interação entre dois dipolos que ocorre a longas distâncias, o dipolo dador vibra com frequência ω_d , a mesma frequência é absorvida pelos dipolos vizinhos, os aceitadores, sem que haja a emissão de fóton pelo dador, assim para a descrição teórica deste mecanismo é introduzido o termo de fóton virtual. Este tipo de interação tem uma distância de ação na ordem dos 0.5 a 10 nm sendo que a sua dependência da distância esta relacionado com a estrutura do aceitador. A magnitude dessa dependência está relacionada com a estrutura do aceitador pela seguinte lei de potência d^{-N} , onde N é determinado pela dimensionalidade do aceitador. Em geral, para um aceitador com estrutura pontual como é o caso de uma molécula, possui uma dependência proporcional

a potencia d^{-6} , esta diminui quando se substitui o dipolo pontual por uma série de dipolos aceitadores dispostos numa única dimensão (1D), tornando a dependência proporcional a potência d^{-5} . Consecutivamente, se tiver um plano formado por vários dipolos, ou seja, confinados em duas dimensões (2D), obtém-se uma dependência da distância proporcional d^{-4} . Empilhando vários planos de dipolos, formando uma estrutura de três dimensões (3D) de dipolos aceitadores, a dependência da distância é proporcional a potência d^{-3} . Estes pré fatores determinam o raio de Först do sistema.

Quando se efetua medições de transferência de energia por FRET, uma grandeza importante a ter em conta é o raio de Förster R_0 , que define a distância para a qual a eficiência de transferência de energia é de 50%, independentemente das estruturas envolvidas. O seu cálculo é efetuado tendo em conta o rendimento quântico e a sobreposição dos espectros de absorção e emissão do aceitador e dador, respetivamente.

$$R_0 \propto \frac{k^2 \Phi_F}{n^4} \int_0^\infty F_{FD}(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (2.13)$$

Pela equação (2.13) verifica-se que o raio de Förster é proporcional ao rendimento quântico de fluorescência (Φ_F), a orientação dipolar (k), ao inverso do índice de refração do meio (n) à quarta potência e à magnitude de sobreposição dos espectros, representada na figura 2.8 pela área realçada a cinzento, que corresponde a quantidade do integral na expressão (2.13). O integral depende da intensidade de fluorescência do dador (F_{FD}), do coeficiente de extinção molar (ε_A) do aceitador num determinado comprimento de onda (λ). O rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) é uma característica importante das espécies fluorescente. Esta representa a taxa de energia que é dissipada por fluorescência, sendo representada pela expressão,

$$\Phi_F = \frac{k_F}{\sum k_r + \sum k_{nr}} \quad (2.14)$$

onde k_F representa a taxa relativa de emissão fluorescente, $\sum k_r$ é o somatório de todas as taxas relativas de emissão radiativa e $\sum k_{nr}$ o somatório de todas as taxas relativas de emissão não radiativa.

Outra quantidade a ter em conta é o rendimento quântico de transferência de energia pelo mecanismo de FRET (Φ_{ET}), que representa a fração de fótons transferidos pelo dador (k_{EF}) pelo número de fótons totais, emitidos (k_F) e transferidos. Para um conjunto de pares dador-aceitador separados por uma distância fixa (d), a eficiência de transferência de energia é descrita pela relação (2.15),

$$\Phi_{ET} = \frac{k_{EF}}{k_{EF} + k_F} \quad (2.15)$$

Sendo

$$k_{EF} = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{d} \right)^6 \quad (2.16)$$

O rendimento quântico de fluorescência na presença de um inibidor pode ser obtido por duas formas, pela razão entre as intensidades de fluorescência do dador na presença e na ausência do aceitador, ou pela razão entre os tempos de vida do estado excitado na presença (τ_{DA}) e na ausência do inibidor (τ_D), equação (2.17).

$$\Phi_F = 1 - \frac{\int I_{DA}(t) dt}{\int I_D(t) dt} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (2.17)$$

Theodor Förster observou este mecanismo pela primeira vez em 1946, mas só nas últimas décadas é que este mecanismo começou a ser explorado. A evolução tecnológica que decorreu nas décadas precedentes a sua descoberta permitiu o progresso das técnicas espectroscópicas, essenciais para o seu desenvolvimento e uso.

Para além da distância entre as moléculas dadoras e aceitadoras, o mecanismo de FRET é também sensível à sua concentração, de notar que altas concentrações pode produzir HomoFRET (Chan, Kaminski, and Schierle), e é sensível a fatores ambientais

como a temperatura, pressão, índice de refração, viscosidade e pH (Borst and Visser). Características exploradas e monitorizadas com o auxílio de sensores que usam o mecanismo FRET como ferramenta de tradução. É igualmente usado na detecção de espécies químicas inorgânicas e orgânicas (Fang et al.; Othman et al.), metais (Wu, Oo, and Fan) e biomoléculas como ADN, enzimas e proteínas (Algar and Krull). A sua dependência da distância permite o estudo de interações de organelos celulares, transferências de substâncias, monitorização de processos biológicos como o dobramento e desdobramento de moléculas (Wallrabe and Periasamy) e hibridação de ADN (Gao et al.). A sua utilização pode ser feita *in vitro* ou *in vivo* (Garcia-Sanchez et al.; Zhao et al.).

A janela de ação do mecanismo é uma limitação para o seu uso e esforços são levados a cabo com a intenção de aumentar a sua aplicabilidade. Há varias maneiras de aumentar a distância de ação, como por exemplo o uso de nanopartículas metálicas. O seu efeito plasmónico localizado modifica a intensidade do campo eletromagnético circundante da espécie fluorescente, proporcionando um aumento no rendimento quântico e na taxa de excitação, e consequentemente, um aumento da intensidade de fluorescência emitida (Figura 2.9).

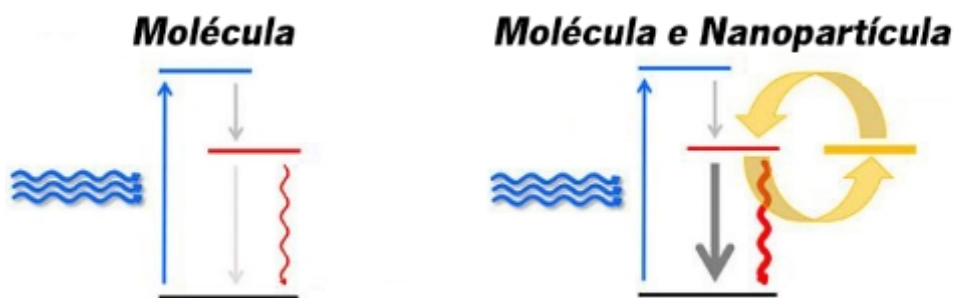


Figura 2.9 – O efeito plasmónico na eficiência da fluorescência. O confinamento da radiação pela superfície plamónica da nano partícula permite a excitação localizada e eficiente de espécies fluorescentes de baixo rendimento, levando a um aumento drástico na emissão fluorescente das mesmas.

Outra via consiste em desenvolver novas espécies fluorescentes com alto rendimento quântico, como é o caso dos pontos quânticos, cada vez mais usados em estudos biológicos. O desenvolvimento de novas plataformas de inibição da fluorescência

é uma via a explorar, assim como novos materiais. Grafeno, grafeno oxide e nanotubos de carbono são excelentes inibidores de fluorescência, sendo os raios de ação de algumas dezenas de nanómetros.

Inibição da fluorescência pelo grafeno.

Grafeno, grafeno oxide e nanotubos de carbono são excelentes inibidores de fluorescência. O grafeno em especial apresenta uma inibição a longas distâncias provocada por decaimentos transversais e processos de retardação (Gómez-Santos and Stauber). Esta característica foi demonstrada teoricamente, no entanto, ainda não foi observada experimentalmente.

A inibição da fluorescência envolve o processo de transferência de energia pelo mecanismo não radiativo FRET, onde a dependência da distância na inibição da fluorescência pelo grafeno já tinha sido demonstrada como r^{-4} (Gaudreau et al.; Swathi and Sebastian), sendo r a distância entre o grafeno e a espécie fluorescente. No estudo em causa, apenas foram tomados em conta acoplamentos longitudinais entre o grafeno e a espécie fluorescente. Estudos teóricos posteriores foram incluído os acoplamentos transversais e efeitos de retardação, sendo que estes modificam a dependência da distância para uma potência r^{-2} para longas distâncias (Gómez-Santos and Stauber). Neste regime a inibição da fluorescência é governada pelos decaimentos transversais.

A taxa de decaimento do estado excitado Γ de uma espécie fluorescente é dada pela soma das contribuições não radiativas Γ_{NR} e radiativas Γ_R .

$$\Gamma = \Gamma_{NR} + \Gamma_R \quad (2.18)$$

Sendo a fluorescência observada na presença do grafeno dada pela relação descrita pela expressão (2.17). No caso de transferência de energia entre uma espécie fluorescente e o grafeno e tendo em conta as contribuições mencionas, o rendimento quântico de fluorescência é dado por,

$$\Phi_F = \left(1 + \frac{\Gamma_{NR}}{\Gamma_R} \right)^{-1} \quad (2.19)$$

Onde a razão entre as contribuições não radiativa e radiativa é definida por,

$$\frac{\Gamma_{NR}}{\Gamma_R} = \beta_1 \widetilde{\gamma}_1 + \beta_2 \widetilde{\gamma}_2 + \beta_3 \widetilde{\gamma}_3 \quad (2.20)$$

Sendo a magnitude dos pré-fatores e a sua dependência da distância dada por,

$$\begin{aligned} \widetilde{\gamma}_1 &= \frac{3^2}{2^9 \pi^3} \alpha \left(\frac{\lambda}{r} \right)^4 \\ \widetilde{\gamma}_2 &= \frac{3}{2^6 \pi} \alpha \left(\frac{\lambda}{r} \right)^2 \\ \widetilde{\gamma}_3 &= \frac{3}{2^4 \pi^3 \alpha} \left(\frac{\lambda}{r} \right)^2 \end{aligned} \quad (2.21)$$

onde λ corresponde ao comprimento de onda de emissão da espécie fluorescente. O pré-fator $\widetilde{\gamma}_1$ é referente a contribuição não retardada do decaimento, acoplamentos longitudinais, enquanto as ultimas duas $\widetilde{\gamma}_2$ e $\widetilde{\gamma}_3$ correspondem as contribuições retardadas do decaimento tendo em conta acoplamentos transversais, predominando a longas distâncias. Os coeficientes β_i representam fatores geométricos que dependem da direção do dipolo correspondente à emissão. Sendo a sua dependência dada por,

$$\begin{aligned} \beta_1 &= \frac{\left(\frac{I_{\parallel}}{2} + I_{\perp}^2 \right)}{I^2} \\ \beta_2 &= \frac{I_{\perp}^2}{I^2} \\ \beta_3 &= \frac{\left(\frac{I_{\parallel}^2}{2} \right)}{I^2} \end{aligned} \quad (2.22)$$

Esta característica do grafeno em combinação com o elevado grau de maturidade do microscópico de fluorescência, muito usado em biologia, apresentam grande potencial para uma nova janela de aplicações. A sua longa distância de ação na inibição da fluorescência é um excelente mecanismo para a medição de distâncias a nível nanométrico, e conseqüente monitorização, identificação e quantificação de reações, processos, mecanismos, interações e entregas controladas, frequentemente analisados em ciências biológicas.

O estudo e visualização da inibição da fluorescência pode ser usado como um mecanismo de identificação de excitações internas comuns em amostras dopadas de grafeno, tais como SPP's (Velizhanin and Efimov). Foi demonstrado em teoria que a relação de dispersão dos SPP's no grafeno pode ser extraída através da relação entre a dependência da distância na inibição e o campo elétrico aplicado para a dopagem da amostra de grafeno. Como já foi mencionado SPP's em grafeno são um foco de interesse a nível industrial, uma técnica de rápida caracterização será importante para facilitar o seu aperfeiçoamento e possíveis aplicações.

Espetroscopia TCSPC

A espetroscopia de fluorescência resolvida no tempo é uma poderosa ferramenta de análise tanto no campo da física fundamental como em estudos biológicos. Implementar a espectralfluorimetria com dependência temporal requer a gravação resolvida no tempo do perfil do decaimento, após a excitação através de um curto pulso laser, sendo o perfil de decaimento do estado excitado obtido através da intensidade de fluorescência emitida. Poder-se-ia tentar gravar o perfil do decaimento resolvido no tempo proveniente de um único ciclo excitação-emissão. No entanto, na maioria dos casos existem problemas práticos que impedem uma solução tão simples como a referida. Em primeiro lugar, o decaimento é demasiado rápido para ser gravado diretamente – a fluorescência típica de uma molécula orgânica, tem a duração de apenas algumas centenas de picossegundos até algumas dezenas de nanossegundos, de modo a registar, não só a existência da fluorescência, mas também o perfil do seu decaimento, é necessário captar o sinal com uma resolução que permita representa-lo por, pelo menos, algumas dezenas de tempos de decaimentos diferentes. Assim, para um decaimento de alguns centenas de picossegundos, o detetor terá de armazenar informação a cada picossegundo.

É difícil atingir este objetivo com os detetores disponíveis, já que tem uma resolução instrumental de algumas dezenas de picossegundos. Além disso, a intensidade de fluorescência pode ser simplesmente demasiado fraca para a construção de uma curva que represente o decaimento. De facto, a intensidade poderá consistir em apenas alguns de fótons por excitação-emissão, mesmo quando alguns milhares de moléculas são iluminadas. Ainda que se possua algo que aumente o poder de excitação, de modo a obter mais fluorescência, haverá limites, por exemplo, devido ao amontoamento de perdas óticas, aos limites e sensibilidade espectrais do detetor ou à fotodescoloração devido a potência elevada da fonte de excitação. A solução para ambos os problemas é a contagem singular de fótons com correlação temporal do inglês *Time-correlated single photon counting* (TCSPC).

Excitando periodicamente a espécie fluorescente podemos alargar a recolha de sinal a múltiplos ciclos, excitação-emissão e reconstruir o perfil de decaimento, através da

contagem singular de fótons. Por cada ciclo mencionado apenas um fóton, correspondente ao sinal da fluorescência, é detetado, sendo o resultado final um histograma, em que cada barra representa a contagem dos fótons detetados por um determinado canal. Cada canal representa um intervalo de tempo, sendo a sua dimensão determinada pela razão entre a janela temporal usada, de acordo com as características do perfil de decaimento, e o número de canais disponíveis no instrumento de aquisição. Na prática, esta dimensão corresponde à resolução do sistema.

Na técnica TCSPC um fóton proveniente da fluorescência, ao chegar ao detetor inicia uma contagem temporal, enquanto o sinal referente a excitação é retido durante um intervalo de tempo escolhido pelo utilizador, sendo a sua função final parar a contagem iniciada pelo fóton proveniente da fluorescência. O tempo decorrido entre o início e o fim da contagem é subtraído ao intervalo de tempo escolhido pelo utilizador. O intervalo de tempo resultante define o canal para o qual a contagem é enviada.

A taxa de fótons que chegam ao detetor influencia o resultado final, é necessário reduzir a taxa umas ordens de grandeza inferiores a taxa de excitação do laser de modo a prevenir a deteção múltipla de fótons e aumentar a probabilidade de deteção de fótons com diferentes tempos de decaimentos.

A técnica TCSPC permite calcular decaimentos na ordem de algumas dezenas de picossegundos até centenas de microssegundos. Para levar a cabo uma experiência de TCSPC é necessário utilizar sistemas eletrónicos especializados, uma vez que os tempos medidos podem ser na ordem dos 20 picossegundos. Assim, utilizam-se montagens foto-eletrónicas como a representada na figura 2.11, para calcular os tempos de decaimentos dos estados excitados.

O fóton referente a fluorescência (*start*) é detetado através de um fotomultiplicador de microcanais. Este detetor consiste numa matriz formada por capilares de vidro com uma dimensão 10 a 25 micrómetros, em que o seu interior é revestido por um material sensível a fótons. Entre as extremidades dos capilares é aplicada uma alta voltagem, de modo que, quando fóton atinge o revestimento fotossensível uma avalanche de eletrões secundários forma-se dentro do tubo, produzindo um pulso de corrente elétrica na base do capilar, que se traduz no sinal analógico a processar, ver figura 2.10.

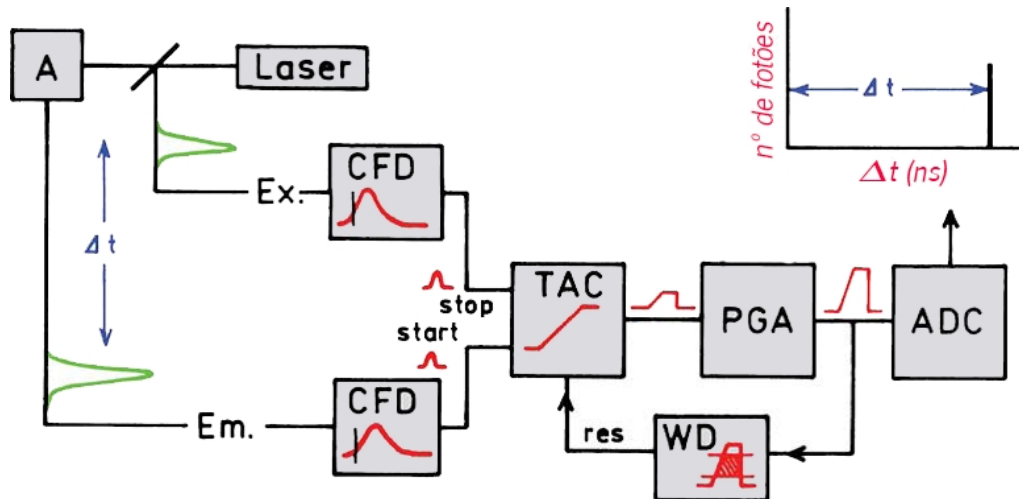


Figura 2.11 – Arquitetura da placa B&H SPC-150 usada na aquisição experimental. Os fótons detetados, um por um, são agrupados num histograma em que cada coluna representa um canal temporal sendo a resolução do sistema de 20ps. O sinal proveniente da amostra (A) é processado por elementos eletrónicos de rápida execução (CFD,TAC,PGA) sendo convertido num sinal digital pelo elemento ADC para a posterior agrupação num histograma.

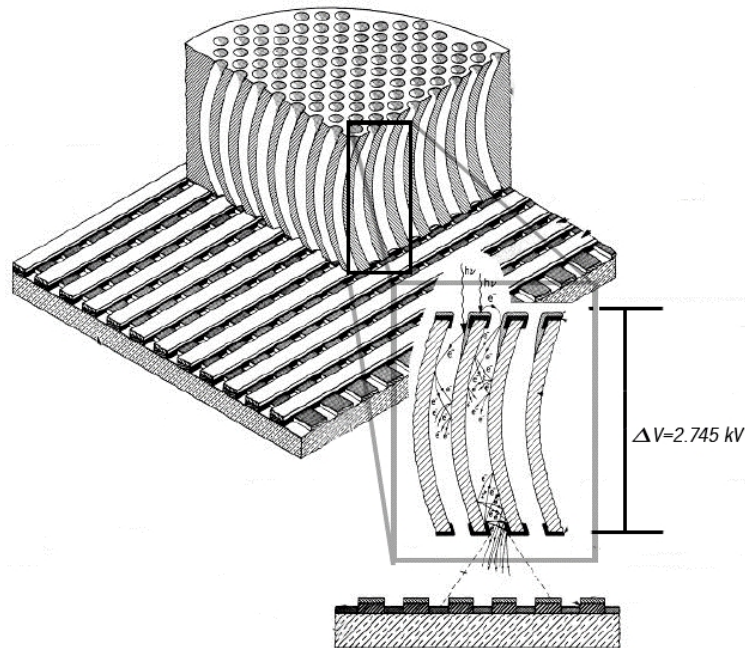


Figura 2.10 – Esquema de uma placa detetora de multicanais. Nas extremidades dos multicanais, revestidos por um coating fotossensível, é aplicada uma alta voltagem que possibilita a formação de uma cascata de eletrões dentro do canal iniciada pelo fóton detetado.

O sinal é enviado então para o elemento eletrónico CFD (*Constant-fraction discriminators*), cuja função é analisar o tempo de subida do pulso e posterior seleção dos

sinais detetados de modo a minimizar efeitos de ruído. Os pulsos gerados no fotomultiplicador possuem um tempo de subida muito rápido, mas semelhantes. Ao contrário a sua amplitude pode diferir, sendo a análise temporal a melhor forma de seleção dos pulsos. O sinal referente ao pulso de excitação (*stop*) é detetado por um simples fotodiodo sendo ele também enviado para um CFD. Os pulsos selecionados são enviados para o elemento eletrónico TAC (*Time to amplitude Converter*). Este cria uma rampa de voltagem que é iniciada pelo sinal *start* e terminada pelo sinal *stop*, que se traduz no tempo de decaimento do fóton detetado. Sendo possível aplicar um ganho ao sinal de saída através do elemento eletrónico PGA (*Programmable gain amplifier*). Todas as etapas mencionadas são realizadas por instrumentos eletrónicos com uma elevada taxa de execução temporal de modo a que o processamento necessário para cada fóton seja o mais curto possível.

O sinal analógico ao efetuar o percurso eletrónico mencionado é convertido num sinal digital equivalente através do elemento ADC (*Analog digital converter*). O sinal digital resultante é então agrupado num histograma de acordo com a sua janela temporal. O elemento ADC possui uma elevada precisão de modo a converter e separar os sinais analógicos nos diferentes canais do instrumento de aquisição, para a posterior agrupação.

TCSPC é uma técnica espectroscópica com um elevado grau de maturidade que permite efetuar os mais diversos estudos em combinação com uma espécie fluorescente adequada ao mesmo. Existe uma imensa variedade de moléculas e espécies fluorescentes, em que os seus tempos de vida do estado excitado dependem de vários fatores do meio onde estão inseridas, tornando-as apropriadas para um largo leque de sensores biológicos, sendo exemplo a sensibilidade ao pH do meio, ao oxigénio, à presença de certos iões, mudanças do índice de refração, de viscosidades, polaridade do meio, entre muitas outras.

Microscopia FLIM

Microscopia de fluorescência teve um grande impacto na investigação científica. O sinal recolhido por este tipo de microscopia consiste na intensidade de fluorescência da espécie usada e as suas flutuações ao longo da amostra. Contudo, a intensidade de fluorescência não é a única informação que se pode retirar de uma espécie fluorescente. O tempo de vida do estado excitado é outra característica que possui informação relevante. É um parâmetro útil para distinguir a origem da fluorescência e representa também um indicador direto da taxa de transferência de energia do estado excitado, como já mencionei anteriormente. O tempo de decaimento é independente da concentração da espécie pelo que a sua análise oferece informação direta de todos os fatores que contribuem para a variação do rendimento quântico de fluorescência.

Microscópio do Tempo de Vida de Fluorescência, do inglês *Fluorescence-lifetime imaging microscopy* (FLIM) consiste na aquisição multidimensional do perfil de decaimento do estado excitado de espécies fluorescentes através da técnica TCSPC efetuada ponto a ponto, e em simultâneo, com um varrimento espacial da amostra. A informação resultante da microscopia FLIM é uma imagem em que cada *pixel* representa perfil de decaimento da respetiva espécie fluorescente presente no ponto espacial onde a aquisição ocorreu (Figura 2.12). Ao mesmo tempo é possível efetuar-se um contraste entre a informação obtida para o tempo de vida com a intensidade adquirida, ou seja, número de fótons representados em cada *pixel*.

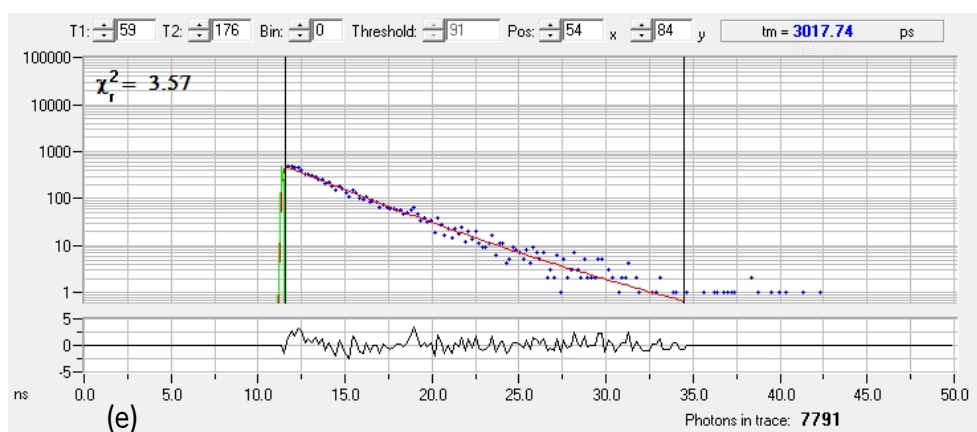
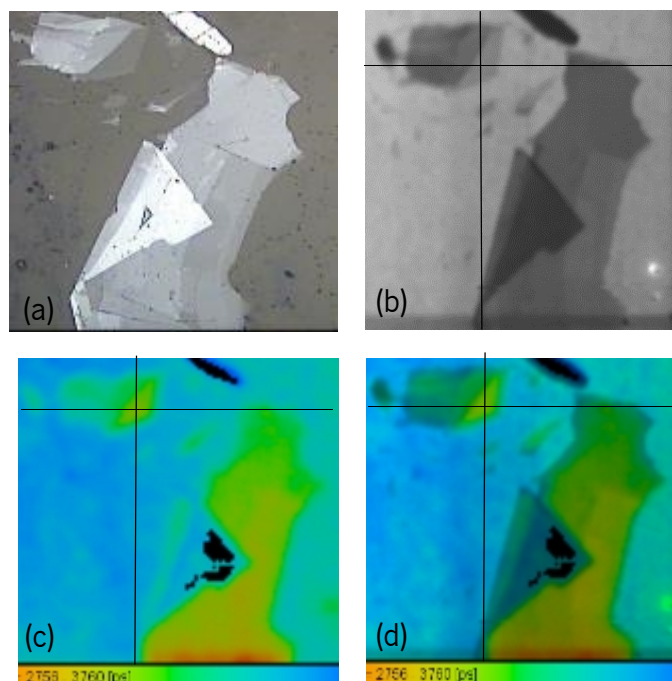


Figura 2.12 – Imagem FLIM de uma estrutura híbrida composta por uma amostra de grafeno e uma molécula fluorescente separados por 20 nm. A amostra de grafeno foi identificada por microscopia ótica (a). A respetiva imagem FLIM contém informação sobre a intensidade fluorescente (b) e os tempos de vida da espécie fluorescente, sendo possível efetuar uma contraste entre as duas informações (d). Cada pixel da imagem FLIM corresponde a um perfil de decaimento como esta presente na sub-figura (e) que corresponde ao pixel referente ao cursor representado em (b), (c) e (d).

Para se obter uma informação exata sobre o tempo de decaimento de um estado excitado é necessário um amplo número de pontos experimentais. Assim, para um decaimento mono exponencial é necessário umas centenas de pontos experimentais para se conseguir uma boa base de análise. O número de pontos experimentais necessários aumenta com o número de exponenciais usadas no ajuste. FLIM e o seu modo de aquisição

esta no entanto, associado um baixo número de contagens devido a dois fatores intimamente relacionados. O primeiro é referente ao número de moléculas por volume de excitação; e o segundo ao tempo de aquisição. O tempo de aquisição pode ser aumentado, mas com isso está-se também a aumentar a foto-degradação das espécies fluorescentes que é diretamente proporcional ao tempo de exposição e é mais perceptível quanto mais baixo o número por volume.

Esta técnica de microscopia é usada no estudo de física fundamental, química e biologia. A possibilidade de observar diferentes estados da mesma espécie fluorescente com elevada facilidade e exatidão ao longo da área em estudo permite, entre outros, o seu uso na observação da entrega controlada de agentes químicos através de plataformas sinalizadas (Lu and Wang), a monitorização de processos bioquímicos ao longo da área celular, observação de reações e espécies químicas em células (Wallrabe and Periasamy), estudo de transferência de energia por meios não radiativos, ou a identificação de efeitos plasmónicos.

Capítulo 3

Procedimento experimental

Para a realização da experiência proposta foi necessário criar estruturas híbridas com distâncias bem definidas entre uma amostra de grafeno e uma camada de Poly(methyl 2-methylpropenoate (PMMA) dopada com uma molécula fluorescente. O estudo da dependência da distância foi auxiliado pela microscopia FLIM. Esta técnica microscópica tem todas as características essenciais para uma excelente execução experimental, pois permite a observação direta da inibição da fluorescência, a referência singular de decaimentos e a sua análise, mas o seu baixo número de contagens não oferece uma base sólida para a análise da dependência. Para o estudo da dependência, os pontos experimentais foram obtidos pela análise espectral de perfis de decaimento, na presença e na ausência de grafeno, adquiridos pela técnica de TCSPC.

Amostras de grafeno

A grafite é um alótropo de carbono composto pela sobreposição de várias camadas de grafeno, fracamente acopladas por ligações Van der Waals. Este fraco acoplamento possibilita, por meios físicos ou químicos, a sua separação em camadas individuais de grafeno.

As amostras de grafeno usadas para o estudo proposto e agora apresentado, foram extraídas de amostras de grafite natural, adquirida através da empresa *NGS Naturgraphit*

GmbH©, e sujeitas a um pré-tratamento por métodos químicos (Bernardo et al.). O objetivo deste pré-tratamento era o de aumentar a distância entre os planos de grafeno, constituintes da grafite, através da intercalação de espécies químicas entre eles. Para isso foram usadas moléculas de óxido sulfúrico (SO_3) como intercalador, devido à sua forma planar que lhe permite fluir com relativa facilidade por entre os planos de grafeno. As amostras de grafite foram colocada numa solução *Oleum* composta por ácido sulfúrico



Figura 3.2 – Primeiro passo da intercalação de espécies químicas entre os planos de grafeno constituintes da grafite. Nestes passo espécies químicas de SO_3 são inseridas entre os planos.

(H_2SO_4) com cerca de $\approx 30\%$ de SO_3 livre. Após o banho, as amostras foram filtradas e lavadas com água. A expansão foi intensificada através de um banho num álcool, onde ocorreram reações isotérmicas, entre o meio e espécies remanescentes de H_2SO_4 e as espécies de SO_3 , formando complexos $\text{EtOH} \cdot \text{SO}_3$. Em seguida foi adicionada a esta solução

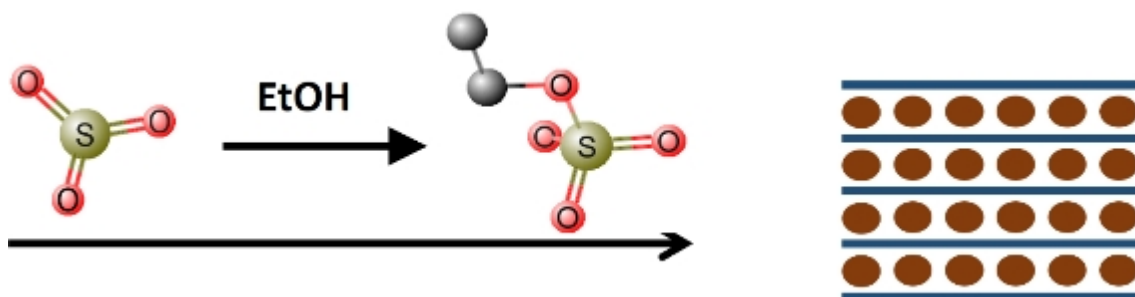


Figura 3.1 - Segundo passo do processo de expansão das amostras de grafite. Depois de filtradas as amostras eram colocadas numa solução de álcool, que originavam uma reação isotérmica com as espécies de H_2SO_4 residuais e as espécie intercaladas de SO_3 originando complexos $\text{EtOH} \cdot \text{SO}_3$.

a base de tetrabutylamónia (TBA) de forma-a aumentar a expansão e reduzir a acidez da solução. Por fim foram levadas ao forno a uma temperatura de cerca de $200\text{ }^\circ\text{C}$ de modo a ocorrer expansão térmica. As altas temperaturas obrigam as moléculas de SO_3 e os complexos de $\text{EtOH} \cdot \text{SO}_3$ a vibrarem forçando a expansão dos planos. A expansão das

amostras de grafite era visível após este passo. Observando-se um aumento de até cinco vezes o tamanho inicial.

De seguida foi efetuada a exfoliação da grafite através de meios mecânicos, com o auxílio de fita-adesiva. O processo é iniciado colocando uma amostra de grafite, pré-tratada entre duas tiras de fita-adesiva. Ao separar as duas tiras foi promovida a separação da amostra em duas partes semelhantes. A amostra resultante da primeira exfoliação é sujeita a repetidas exfoliações até à obtenção de um produto final constituído por um número reduzido de planos de grafite. O produto final é então transferido para uma lamela de vidro, a qual era previamente limpa recorrendo a solventes orgânicos como a acetona e o etanol, seguindo-se uma limpeza mais profunda efetuada através de um plasma de árgon durante cinco a dez minutos. A limpeza dos suportes onde é depositado o produto final da exfoliação é crucial pois facilita a aderência do grafeno ao suporte através de ligações Van der Waals.

A visualização do produto final e a posterior identificação das amostras de grafeno, depositadas numa lamela de vidro, era efetuada através de um microscópio ótico de reflexão e auxiliada por métodos de aumento do contraste. O grafeno absorve apenas 2,3% da radiação com incidência normal e a refletividade associada é insignificante, o que perfaz um contraste de $\approx 7\%$, de acordo com a expressão (3.1), tornando a sua identificação em suportes transparentes difícil.

Visualização e identificação das amostras de grafeno

A sua espessura de apenas um átomo e uma absorção de apenas 2.3% da radiação com incidência normal e uma refletividade insignificante, torna árdua a tarefa da sua visualização e identificação em suportes transparentes, como é o caso do vidro e do quartzo, e em materiais refletivos, como é caso dos metais. É necessário usar métodos que auxiliem a visualização do grafeno em microscópio ótico de reflexão ou transmissão.

Um dos primeiros métodos auxiliares usados assentava na deposição do resultado final da exfoliação, num suporte refletor, como o silício, revestido por uma ou várias camadas de um dielétricos com uma espessura total na ordem do comprimento de onda, de modo a produzir interferência, construtiva ou destrutiva, entre a radiação proveniente do suporte na presença e na ausência de grafeno (Blake et al.). O método funciona extraordinariamente bem, mas os seus requisitos específicos torna-o caro e obsoleto. E a necessidade de recorrer a métodos para transferir as amostras para um substrato apropriado (Choi) para a condução das experiências torna ainda mais penoso o seu uso.

Nos anos precedentes desenvolvi em conjunto com o grupo de investigação, no qual estou inserido, métodos alternativos e de fácil aplicabilidade. A aplicação de micro bolhas sobre o substrato no qual foi depositado o produto final da exfoliação (Gonçalves, et al.), permite a visualização das amostras de grafeno de forma rápida, simples e fidedigna. O carácter hidrofóbico do grafeno não permite a formação de micro bolhas na sua superfície, deste modo, o contraste é enaltecido e a sua localização é facilmente identificada (Figura 3.8). Outro método foi desenvolvido e publicado no decorrer desta dissertação e consiste em aproximar e otimizar os índices de refração do suporte e da objetiva do microscópio (Gonçalves, et al.) através da introdução, entre eles, de um líquido de carácter inerte para não danificar as amostras de grafeno. Dependendo do lado pelo qual estamos a aproximar os índices de refração obtém-se regimes diferentes para o contraste do grafeno, ver figura 3.3.

O contraste de uma amostra de grafeno é calculado pela expressão,

$$C = \frac{I(m) - I(m = 0)}{I(m = 0)} \quad (3.1)$$

e define a intensidade relativa entre a presença ($I(m)$) e a ausência de uma amostra de grafeno ($I(m = 0)$), onde m representa o número de camadas de grafeno. A intensidade é dada pelos coeficientes de refletividade do suporte (r), na presença e na ausência do grafeno. A sua magnitude é calculada pelo coeficiente de reflexão de Fresnell através da expressão (3.2),

$$r = \frac{n_1 - n_2 - m\pi\alpha}{n_1 + n_2 + m\pi\alpha} \quad (3.2)$$

para radiação com incidência normal e polarização linear, onde n_1 e n_2 representam os indices de refração dos meios, em cima e abaixo da amostra de grafeno, e α a constante de estrutura fina, substituindo na equação (3.1) obtemos a expressão (3.3).

$$C = \frac{4mn_1\pi\alpha(-n_1^2 + n_2(n_2 + m\pi\alpha))}{(n_1 - n_2)^2(n_1 + n_2 + m\pi\alpha)^2} \quad (3.3)$$

Ao se inserir o líquido entre o suporte e a objetiva, várias reflexões residuais são produzidas pelo incompleto acoplamento dos índices de refração. Foi adicionada uma constante fenomenológica R que representa não só as reflexões devido ao imperfeito acoplamento dos índices de refração, mas também o nível de ruído residual da camera CCD usada na captação das imagens das amostras de grafeno para a análise do contraste. Adicionando a constante na equação anterior, resulta a equação modificada para o contraste, com $R \ll \pi\alpha$.

$$C = \frac{4mn_1\pi\alpha(-n_1^2 + n_2(n_2 + m\pi\alpha))}{((n_1 - n_2)^2 + (n_1 + n_2)^2 R)((n_1 + n_2 + m\pi\alpha)^2)} \quad (3.4)$$

Efetuando uma simulação usando a equação (3.4) variando o índice do meio, observam-se dois picos máximos para o contraste. Este inverte o sinal para índices do meio superiores a 1,54, ver figura 3.3, originando um regime negativo, isto significa que o suporte fica mais radiante que a amostra de grafeno. Este efeito já tinha sido observado por outro grupo (Dorn et al.), mas não ofereceram uma análise aprofundada, ao contrário, a análise aqui apresentada oferece uma perspectiva mais detalhada do efeito. Para a verificação experimental do método foi usada a montagem experimental presente na figura 3.3. Foi selecionada uma amostra composta por grafeno e uma dupla camada de grafeno (Figura 3.4) e foram usados os líquidos glicerol, óleo de imersão e quinolina, com um índice de refração de 1,47, 1,48 e 1,62 respetivamente, para a medição do aumento de contrastes, assim como, a visualização dos dois regimes, ver figura 3.3.

O método é simples e de fácil utilização e pode ser estendido como um meio de contagem de camadas de grafeno, devido à dependência do contraste com o número de camadas.

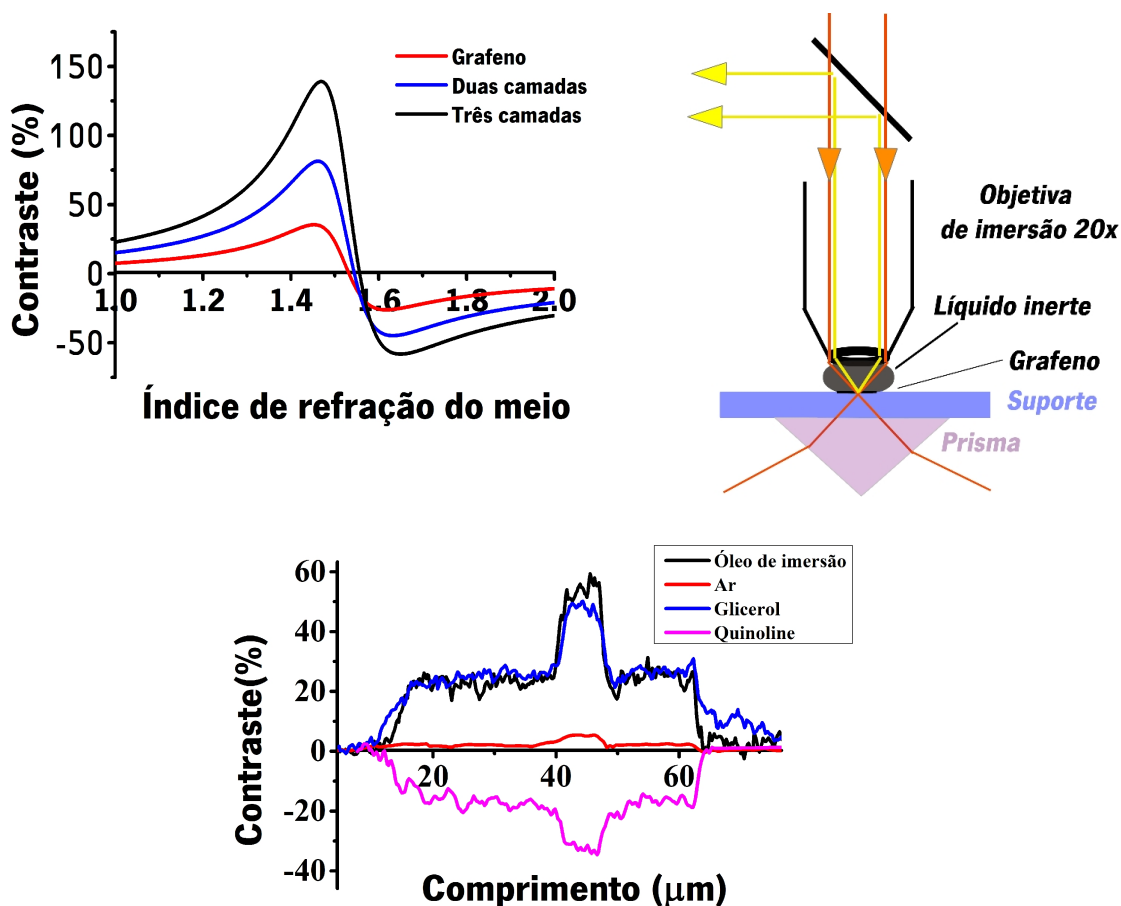


Figura 3.3 – Teoria e experiência do método de aumento do contraste de grafeno por aproximação dos índices de reflexão do suporte e da objetiva. Na simulação (a) observam-se dois picos máximos para o contraste referentes aos dois regimes, negativo e positivo. Para a verificação experimental foi usado o esquema apresentado em (b). A experiência mostrou um aumento do contraste em comparação com o ar, assim como os dois regimes (c). Em (c), o perfil foi obtido no lado superior do retângulo azul presente na Figura 3.4 para todos os meios. Para o regime positivo foi usado ar, glicerol e óleo de imersão com um índice de refração 1,0, 1,47 e 1,48 respectivamente e para a observação do regime negativo foi usado quinolina com um índice de refração 1,62.

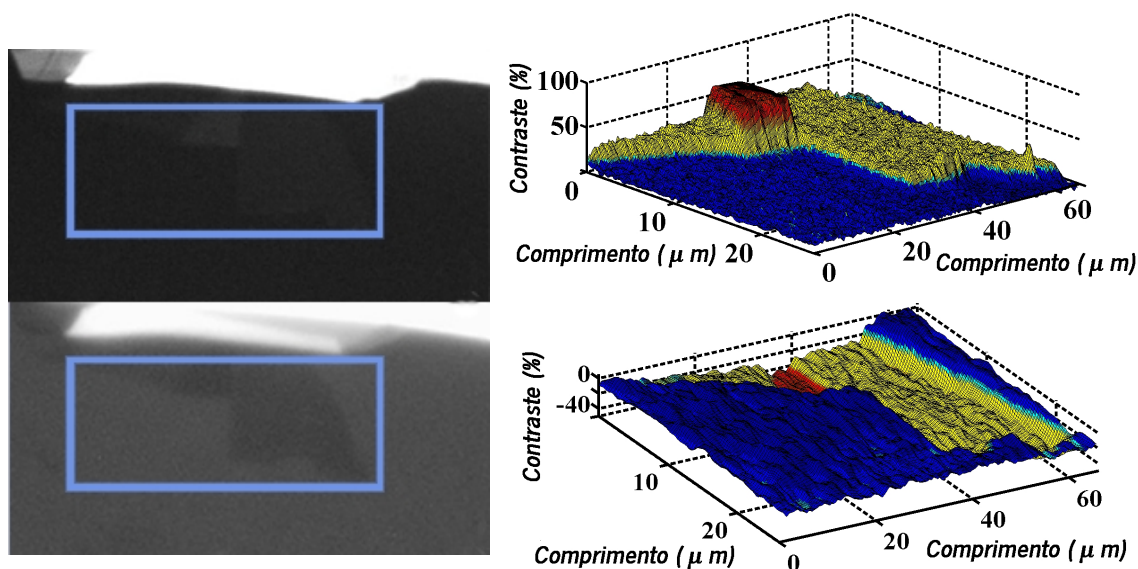


Figura 3.4 – Perfil da superfície da amostra de grafeno e da dupla camada de grafeno e o respectivo regime e aumento do contraste. Em (a) está a amostra usando o óleo de imersão como o meio e o respectivo perfil em (c). Em (b) está a amostra usando o líquido quinolina e o respectivo perfil em (d), através deste verifica-se a mudança de regime no contraste.

Spin Coating

Estabelecer uma distância bem definida de alguns nanómetros entre o grafeno e uma molécula fluorescente foi um grande desafio experimental. Para a aplicar, nas estruturas híbridas idealizadas, recorreu-se a técnica de *spin coating*.

Spin coating é uma das técnicas mais vigorosas na indústria dos semicondutores sendo muito usada para a deposição de filmes foto-resistentes, e é geralmente usada na aplicação de filmes finos depositados no topo de um substrato. A espessura dos filmes finos depositados depende maioritariamente de três fatores, a concentração do polímero ou resina em solução, da velocidade de rotação do substrato, aquando da deposição do filme, e da viscosidade da solução. Assim,

$$r(t) = \frac{r_0}{\sqrt{1 + 4Kr_0^2 t}} \quad (3.5)$$

a espessura do filme em função do tempo de deposição ($r(t)$), depende da espessura inicial r_0 e da constante K que representa a cinemática da viscosidade e é definida por,

$$K = \frac{\rho \omega^2}{3\eta} \quad (3.6)$$

e relaciona a densidade do líquido (ρ), a viscosidade da solução polimérica (η), e a velocidade de rotação do substrato (ω). Pelas expressões anteriores é possível verificar duas opções para a produção de filmes finos com diferentes espessuras, fixando a velocidade de rotação e variando a concentração da solução polimérica, ou, fixar a concentração e variar a velocidade de rotação. A expressão (3.5) baseia-se em teoria dos fluidos e representa um caso ideal, não tem em conta a variação da viscosidade ao longo do tempo de deposição devido a evaporação do solvente. Assim, para obter uma análise mais detalhada é necessário inserir a taxa de evaporação do solvente e a relação com a variação da viscosidade ao longo do tempo, o que aumenta os fatores de análise que influenciam a espessura final da camada.

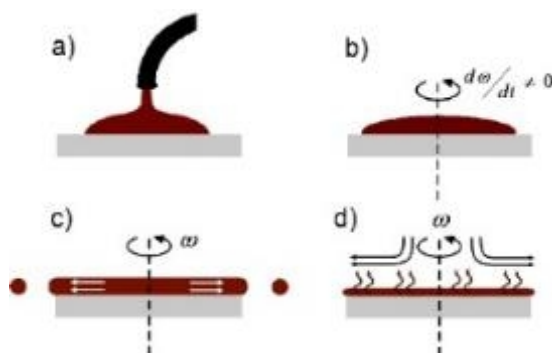


Figura 3.5 – Esquematização da técnica de spin-coating e as várias etapas importantes na deposição; (a) deposição da solução polimérica, (b) aceleração do suporte; (c) regime de homogeneização do filme efetuado a velocidade constante; (d) evaporação do solvente durante a homogeneização do filme, solventes com baixo ponto de ebulição representa uma melhor homogeneização.

A análise mencionada não oferece um controlo preciso da espessura do filme, porque não tem em conta muitos dos parâmetros que influenciam a espessura final. Para a progressão da experiência, a espessura dos filmes foi controlada seguindo o trabalho desenvolvido pelos investigadores Christopher B. Walsh, Elias I. Franses (Walsh and Franses). Eles desenvolveram uma expressão simples para um caso específico de

deposição de camadas de PMMA, usando uma solução polimérica de PMMA dissolvido em tolueno. Através dos resultados experimentais, conseguiram relacionar com grande exatidão a concentração da solução, a velocidade de rotação e espessura final da camada depositada. A equação é puramente empírica, muito simples e de fácil aplicação.

$$r = 0.92C^{-1.56}\omega^{-0.51} \quad (3.7)$$

A equação paramétrica (3.7) relaciona a espessura do filme (r) em micrómetros (μm) com a velocidade de rotação (ω) em rotações por minuto (rpm) e com a concentração da solução polimérica (C) em percentagem de peso ($\text{wt}\%$).

Para se ter um controlo sobre a espessura resultante da deposição, é necessário relacionar a espessura teórica com a espessura resultante, visto que o instrumento usado na deposição pelos investigadores não é igual ao disponível para a deposição. A elipsometria era a técnica ideal para este passo, a mesma foi usada pelos investigadores Christopher B. Walsh, Elias I. Franses para obter a equação (3.7), no entanto, está não está disponível no centro de física, o que levou a procurar alternativas. Assim, para o controlo da espessura foram efetuados testes colorimétricos (Henrie et al.), semelhante ao apresentado na figura 3.6, em suportes circulares de silício, de modo a ter um controlo sobre a espessura resultante. Para isso, foram depositadas camadas de PMMA com uma espessura na ordem do comprimento de onda, de modo a produzir um padrão de interferência, através do qual era possível comparar as cores, teórica e experimental. Através deste, observou-se um afastamento da teoria de 3 a 5%, para distâncias entre os 200 e 400 nm. Tendo em conta esta análise, foi adicionado um erro simbólico de 1nm as distâncias entre o grafeno e a camada dopada presente na tabela 3.2.

A qualidade da camada depositada depende da forma do substrato. Substratos com forma circular representam a melhor escolha para uma deposição homogénea em toda a superfície. Contudo, devido as especificações da experiencia, foram usadas simples lâminas de vidro de microscopia ótica. As suas características de neutralidade, transparência ótica e fácil manuseamento encaixaram nas especificações da experiencia, mas a sua forma retangular não representam uma escolha eficiente. A deposição neste tipo de substratos não é homogénea em toda a superfície, sendo que nas extremidades do

substrato a espessura do filme tem tendência a ser mais espessa e observa-se um padrão ondulatório nos cantos. Este facto deve-se a natureza radial da deposição e a tensão superficial que este tipo de geometria oferece à dispersão da solução polimérica, o que resulta num padrão uniforme no centro do substrato e um padrão não uniforme nos extremos do substrato, ver figura 3.6. Esta limitação não representa um obstáculo à experiência, mas foi necessário estabelecer um critério padrão na seleção das amostras; escolher amostras próximas do centro do substrato. Foi também estabelecido que a deposição das camadas, com diferentes espessuras, era efetuada mantendo a velocidade de rotação fixa e variando a concentração das soluções polimérica, para assegurar uma maior homogeneidade das camadas depositadas.

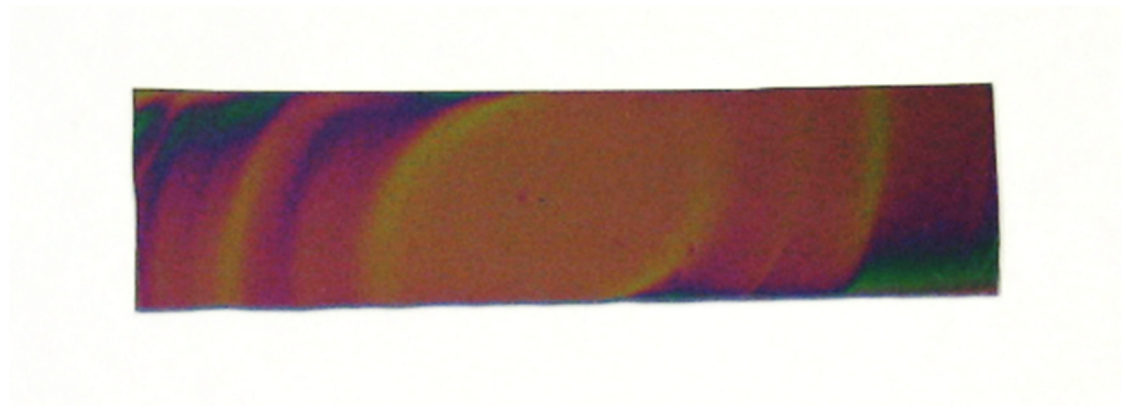


Figura 3.6 – Resultado da deposição de uma camada ao longo de um substrato retangular de silício. Através da interferência ótica é possível verificar o padrão resultante da deposição por spin coating; uma zona homogénea no centro do substrato e um padrão ondulatório nas extremidades, resultado da deposição radial e das tensões superficiais oferecidas pela forma geométrica do substrato.

Quando é aplicada uma camada de um dielétrico num suporte com uma espessura com algumas ordens de grandeza superior à espessura da camada depositada, sujeita-a a um constrangimento de ter a mesma área superficial do suporte, o que cria tensões na superfície (Alcoutlabi and McKenna). Estas tensões a que a camada está sujeita, podem ser categorizadas como intrínsecas e extrínsecas. As intrínsecas estão associadas a natureza da deposição e da cristalização do dielétrico durante a formação da camada. As extrínsecas estão associadas as condições ambientais como a variação da temperatura, geometria do suporte e forças externas.

Durante as quatro etapas do processo de spin coating (Figura 3.5) o solvente da solução polimérica usada evapora-se, levando a um aumento da concentração do polímero no substrato o que provoca a transição para a fase vidro do mesmo. Quando o polímero se encontra nesta fase a taxa de evaporação do solvente diminui o que provoca tensões na camada depositada. Estas tensões vão diminuindo com o tempo até a camada encontra um equilíbrio com o meio ambiente, que para temperaturas muito mais baixa que a temperatura da fase vidro do polímero (Hodge) ($T \ll T_g$) podem ter uma longa duração. A remoção destas tensões é crucial para uma excelente e homogênea deposição da camada dopada, depositada sobre a primeira camada. Para a remoção rápida destas tensões, o resultado da deposição por *spin coating*, foi levado a uma atmosfera com uma temperatura igual à temperatura de transição para a fase vidro do polímero, que para o caso do PMMA corresponde a temperaturas no intervalo de 90° C a 140°C. Nestas temperaturas as cadeias poliméricas não tem energia suficiente para apresentar mobilidade, deste modo, a sua resposta é puramente elástica (Roth and Dutcher) e como estão sujeitas ao constrangimento, de manter a mesma área superficial do suporte, impede-as de formar deformações na camada. A fase de transição para a fase vidro é uma fase de relaxação das moléculas do polímero que depende, em geral, do tamanho das suas cadeias poliméricas. A este processo de relaxação é chamado de *annealing*.

A qualidade da deposição também é influenciada pela rugosidade presente no suporte. Quando se transfere o resultado da exfoliação da grafite para o suporte, uma

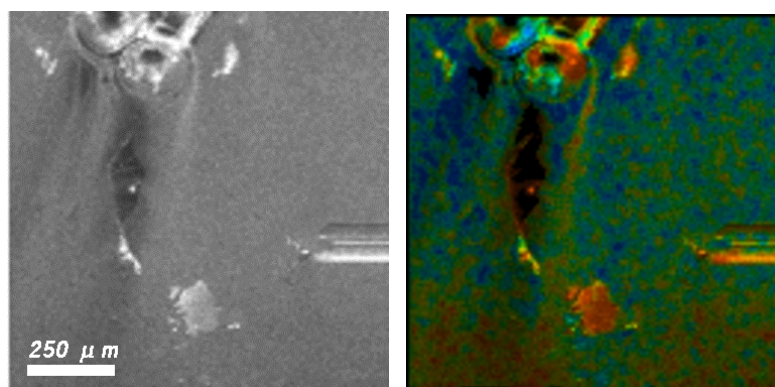


Figura 3.7 – Defeitos nas camadas depositadas por spin coating, visualizados através da microscopia FLIM. Estes, são resultado da rugosidade criada pela transferência do resultado da exfoliação mecânica para o substrato

rugosidade extra é adicionada a superfície do suporte. Esta rugosidade adicional era um fator que influenciava a deposição das camadas do dielétrico, originando defeitos na deposição que eram invisíveis, mesmo em microscópio ótico de reflexão, no entanto eram visíveis em microscopia FLIM devido as variações de intensidade da fluorescência provocada pelas drásticas mudanças na densidade de moléculas fluorescentes devido a tais defeitos, ver figura 3.7.

Spin coating é uma técnica muito sensível ao meio ambiente, e para uma excelente deposição é necessário tomar várias precauções antes de se proceder a deposição, tais como, uma limpeza profunda do instrumento de deposição e uma atmosfera limpa.

Estruturas

Para a realização da experiência foi escolhida a molécula fluorescente Perylene que tem um espectro de emissão entre 420-550nm (Figura 3.10). Possui um alto rendimento quântico de fluorescência, uma excelente fotoestabilidade e é muito estável termicamente. Tem uma estrutura plana (Figura 3.9) resultante das ligações híbridas sp^2 entre os átomos de carbono sendo a sua fórmula química $C_{20}H_{12}$, possui uma alta solubilidade em tolueno, solvente orgânico usado para preparação da solução polimérica, e não possui grupos rotacionais e funcionais o que permite minimizar o efeito da imobilização na matriz polimérica. Possui um tempo de decaimento de 3 a 4 ns em solução dependendo de vários fatores como a polaridade do solvente, pH da solução, temperatura e pressão.

As estruturas híbridas construídas são formadas por uma amostra de grafeno, uma camada de PMMA (distância), e uma camada de PMMA dopado com perylene (espécie fluorescente). A sua estrutura de camadas está esquematizada na figura 3.8.

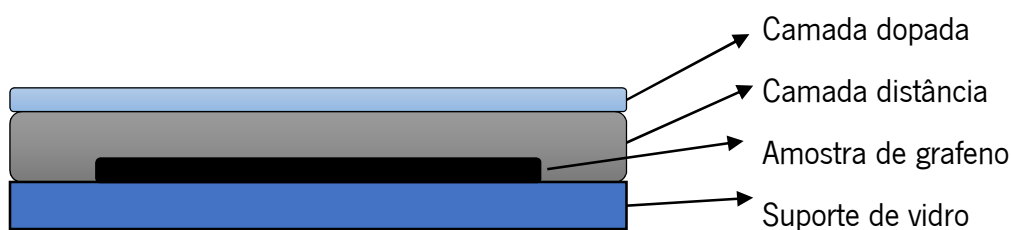


Figura 3.8 – Esquema da estrutura híbrida idealizada para execução da experiência proposta. As amostras de grafeno foram depositadas num suporte de vidro sobre a qual foi depositado uma camada de espaçamento para o estudo da dependência da distância na inibição da fluorescência da espécie fluorescente imobilizada na camada dopada pelo grafeno.

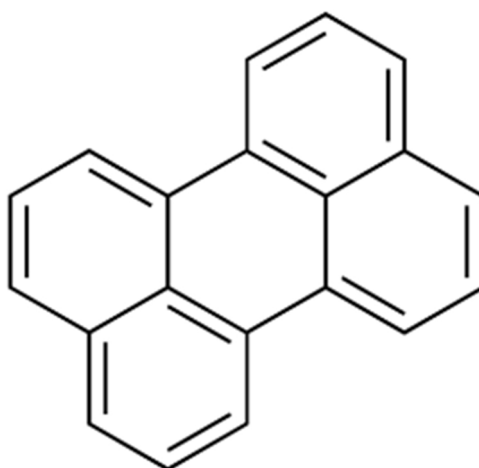


Figura 3.9 – Estrutura da molécula fluorescente perylene.

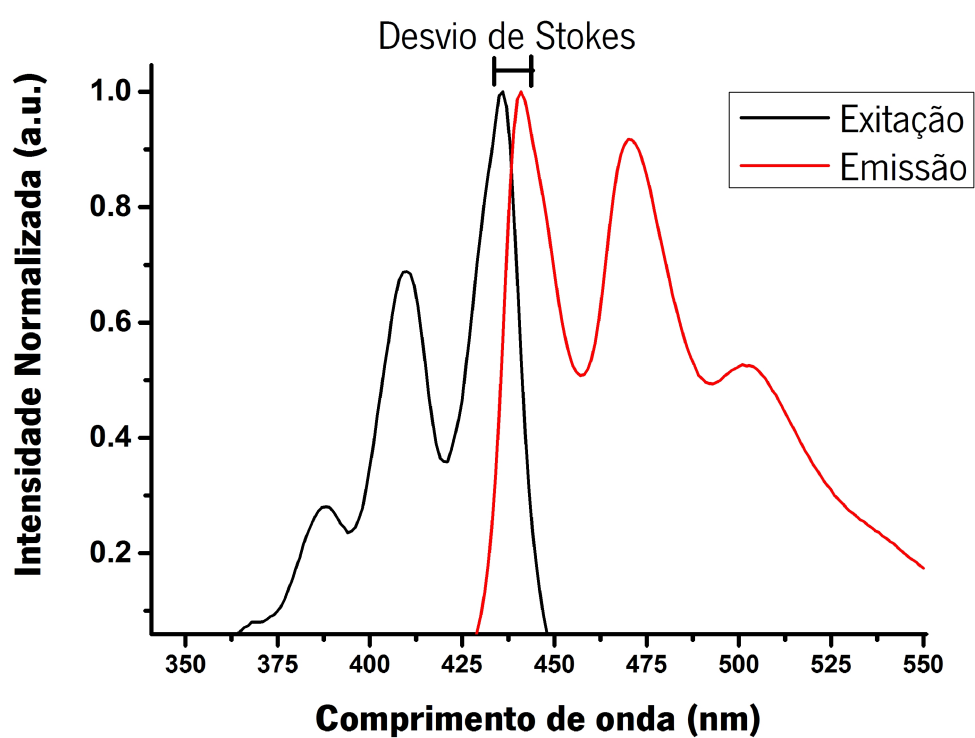


Figura 3.10 - Espectro de excitação e emissão da molécula perylene quando imobilizada na camada de PMMA depositada sobre uma lamela de vidro.

Em suma, as amostras de grafeno obtidas através da exfoliação mecânica da grafite eram visualizadas e referenciadas através da microscopia ótica de reflexão sendo a confirmação de uma única camada efetuada pela espectroscopia Raman. Escolhidas as amostras, procedeu-se a construção das estruturas híbridas essenciais para a progressão da experiencia. Em primeiro lugar foi depositada a camada de PMMA cuja função é estabelecer a distância, bem definida, entre a molécula perylene e o grafeno. Após a deposição era colocada num forno à temperatura de 140°C durante 60 minutos com o objetivo de extrair o resto do solvente orgânico e remover as tensões da camada. A camada de PMMA dopada com a molécula fluorescente era depositada em último lugar, sendo também levada ao forno, após a deposição, à temperatura de 90°C durante 60 minutos. A verificação da deposição era efetuada através da visualização do padrão criado após a aplicação de micro bolhas de água, ver figura 3.11.

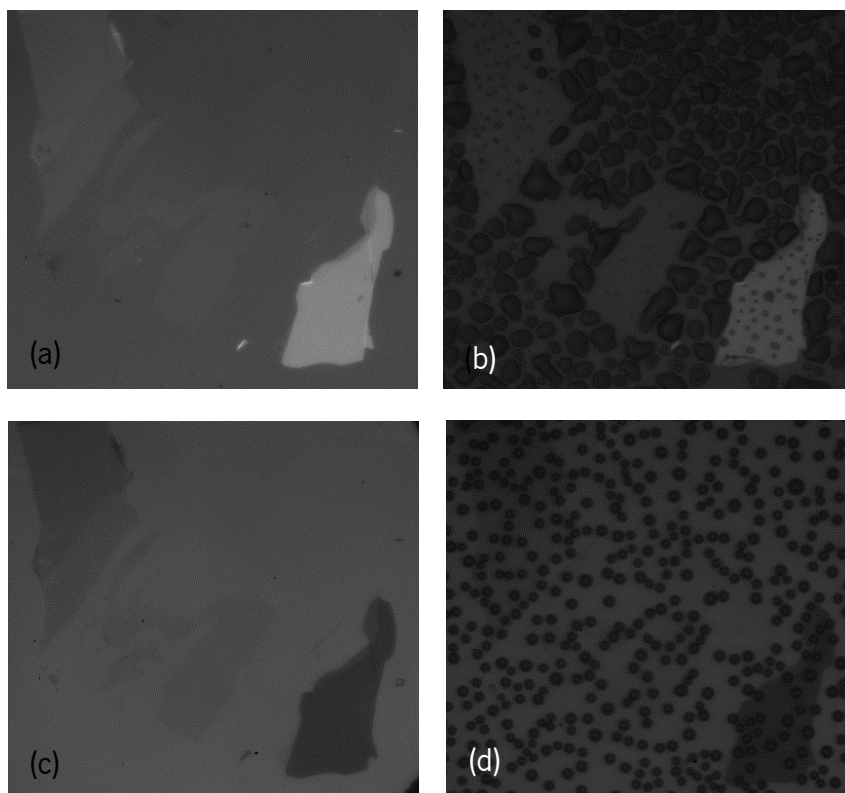


Figura 3.11 – Confirmação da deposição das camadas constituintes das estruturas híbridas. A amostra de grafeno depositada no vidro (a) não permite a formação de micro bolhas devido a sua característica hidrofóbica (b). Após a deposição das camadas constituintes (c) é visível a formação das microbolhas na posição referente a amostra de grafeno (d). Isto confirma a deposição em conjunto com a homogeneidade das microbolhas observada sobre as camadas depositadas (Figura 3.17).

A característica hidrofóbica do grafeno não permite a formação de micro bolhas na sua superfície, assim com a presença das camadas de PMMA verificamos a sua formação no lugar referente a amostra de grafeno, confirmando a sua deposição. Verifica-se também uma grande homogeneidade na forma e no tamanho das microbolhas sobre as camadas de PMMA, o que indica ausência de defeitos e uma ótima homogeneidade da deposição e textura da camada.

A análise do espectro de fluorescência das estruturas oferece também informação sobre a qualidade da camada dopada, sendo também um indicador do grau de fidelidade da técnica de *spin-coating*, ver figura 3.12.

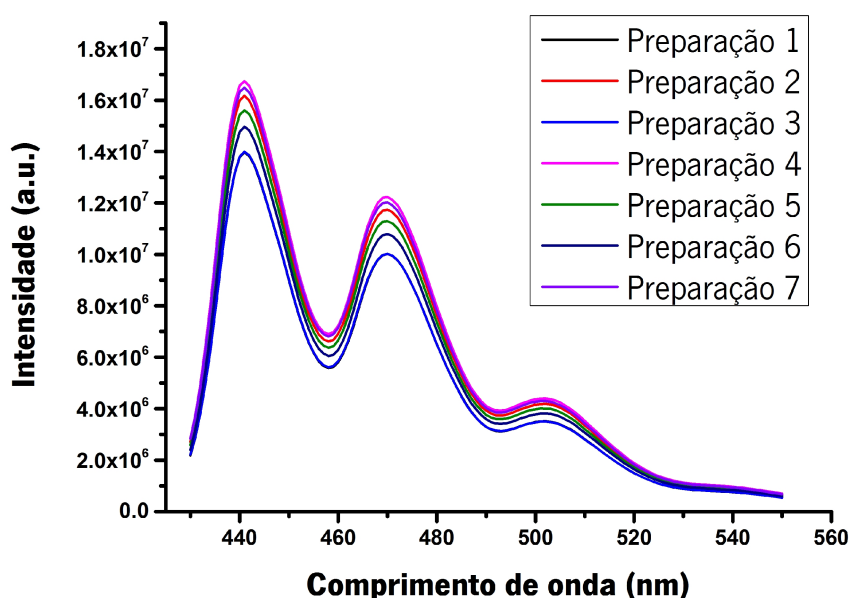


Figura 3.12 – Espectros de emissão de fluorescência da molécula perylene usada para dopar a respectiva camada. Pela análise dos espectros referentes a várias lamelas de vidro as quais foi aplicado uma camada dopada nas mesmas condições, concentração e velocidade, conclui-se que a técnica de *spin coating* é viável e reproduzível.

Foram criadas varias estruturas com diferentes espessuras na camada de PMMA que separa a camada dopada do grafeno (Tabela 3.1). A variação mencionada foi efetuada recorrendo a técnica de spin coating em que a espessura do filme foi calculada através da equação (3.7). A velocidade de rotação foi mantida fixa em 3000 rotações por minuto (rpm) para obter uma boa homogeneidade dos filmes aplicados. As diferentes espessuras da camada separadora foram obtidas fazendo variar a concentração da solução polimérica.

Assim foram criadas soluções para as respectivas espessuras de PMMA 0, 15, 17, 23, 26, 30, 42, 60 e 70 nm para efetuar o estudo da inibição da fluorescência a longas distâncias, sendo que, a solução polimérica referente a camada dopada continha uma concentração de perylene de 0.1 milimolar (mM).

Camada Distância			Camada Dopada		
Espessura (nm)	Concentração PMMA [wt%]	Rotações (rpm)	Espessura (nm)	Concentração PMMA [wt%]	Rotações (rpm)
0	0	0	2	0.1	3000
15	1.0	3000	2	0.1	3000
17	1.1	3000	2	0.1	3000
20	1.2	3000	2	0.1	3000
23	1.3	3000	2	0.1	3000
26	1.4	3000	2	0.1	3000
32	1.6	3000	2	0.1	3000
42	1.9	3000	2	0.1	3000
50	2.1	3000	2	0.1	3000
60	2.4	3000	2	0.1	3000
70	2.6	3000	2	0.1	3000

Tabela 3.1 - Características das estruturas híbridas construídas, espessura, concentração polimérica usada para a deposição das respectivas camadas e a respectiva velocidade de deposição.

Aquisição dos dados

Foi montada um FLIM (Figura 3.15), baseado num sistema laser ultra rápido Ti:Safira, bombeado por um laser de estado sólido Nd:YVO₄ que debita em modo contínuo radiação com 532nm. O laser Ti:Safira laser pode ser operado desde 700nm até cerca de 900 nm sem ser necessário alterar a configuração ótica e pode ser operado em modo contínuo ou em modo pulsado. Sendo que, em modo pulsado, o laser Ti:Safira laser debita pulsos laser altamente polarizados com a duração típica de 100 fs e uma taxa de repetição de aproximadamente 76 MHz. A criação dos pulsos é efetuada através da técnica de “*mode-locking*” e consiste em selecionar alguns comprimentos de onda (*modes*) que se propagam pela cavidade ótica do laser, onde as respetivas fases estão fixadas de modo a que, em apenas um ponto da cavidade haja interferência construtiva e no resto da cavidade destrutiva. O resultado final é um feixe laser pulsado em que a distância entre dois pulsos consecutivos ($\Delta \tau$) é imposta pela distância entre os dois espelhos nas extremidades da cavidade (L) e a velocidade da luz (c) através da razão (3.8) e corresponde ao tempo necessário para percorrer a cavidade do laser.

$$\Delta \tau = \frac{2L}{c} \quad (3.8)$$

Este tempo também impõem a distância espectral entre os modos ressonantes da cavidade através da expressão,

$$\Delta \nu = \frac{1}{\Delta \tau} \quad (3.9)$$

A duração do pulso (Δt) é determinada pelo número de *modes* (N) que estão a vibrar com a mesma fase.

$$\Delta t = \frac{0.315}{N \Delta \nu} \quad (3.10)$$

Na expressão (3.10) o número 0.315 representa o perfil do pulso, que neste caso, tem a forma do quadrado da secante hiperbólica (sech^2). O processo de *mode-locking* só é possível devido a propriedade não-linear do cristal Ti:Safira designada por auto focagem ou *Kerr-lens* que permite a focagem de radiação muito intensa. Para o caso de um pulso laser a sua dimensão temporal traduz-se numa energia aparente muito intensa sentida pelo cristal. Para iniciar o efeito de auto focagem é introduzida uma pequena perturbação no feixe laser dentro da cavidade através de um elemento ótico-mecânico, suficiente para adicionar um ganho na intensidade do feixe laser. Este ganho é ampliado pelas passagens pelo cristal Ti:safira.

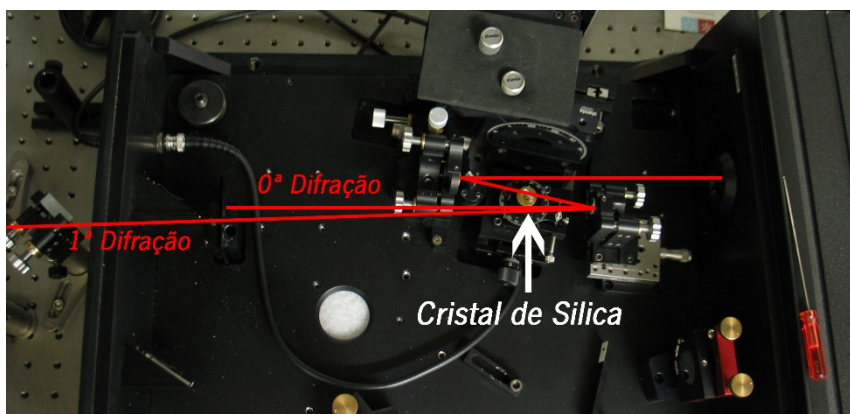


Figura 3.13 – Foto do instrumento pulse-picker e ilustração da sua função. A peça central do instrumento, cristal de sílica fundida, é usado para a seleção sincronizada de pulsos laser, através de um efeito foto-acústico, com o propósito de espaçar a distância temporal entre dois pulsos consecutivos.

A distância temporal entre dois pulsos lasers consecutivos é definida pelo comprimento da cavidade, que para o sistema laser usado corresponde a 13.3 ns o que é um tempo muito próximo do tempo de decaimento do estado excitado da molécula perylene usada na realização da experiencia. Foi necessário diminuir a taxa de repetição do laser para aumentar o tempo de relaxação da molécula e prevenir a foto degradação. Para esta tarefa foi usado o instrumento *pulse-picker* que permite reduzir a taxa de repetição do laser num fator de 10 ou mais (Figura 3.13) através de um efeito ótico-acústico. O seu elemento central é um cristal de sílica fundida colocado numa base piezoelétrica que, ao se aplicar uma radiofrequência (RF) à base, modificamos o seu índice de refração, alterando assim a ordem de difração do feixe laser que se propaga pelo cristal.

Esta alteração no índice de refração provoca uma difração periódica do feixe incidente, o que permite selecionar apenas alguns pulsos do feixe laser. Assim ao se aplicar uma radio frequência de forma pulsada e sincronizada, de modo que, quando a RF é aplicada, apenas a difração de um pulso do laser é modificada. Assim, obtemos um segundo feixe laser com uma taxa de repetição igual a taxa de aplicação da radiofrequência. Para esta experiencia foi aplicada uma RF com uma taxa de repetição de cerca de 7.8 MHz correspondendo a um espaçamento de 133 ns no feixe laser resultante.

Para obter o comprimento de onda ideal para a excitação da molécula fluorescente foi usado um cristal não linear de geração do segundo harmónico (Figura 3.14). Foram também usados filtros para reduzir a intensidade do laser resultante da geração do segundo harmónico para uns 0.4 microwatts (μW), em média, de modo a reduzir o número de contagem que chegam ao detetor, prevenindo a deteção simultânea de fotões.

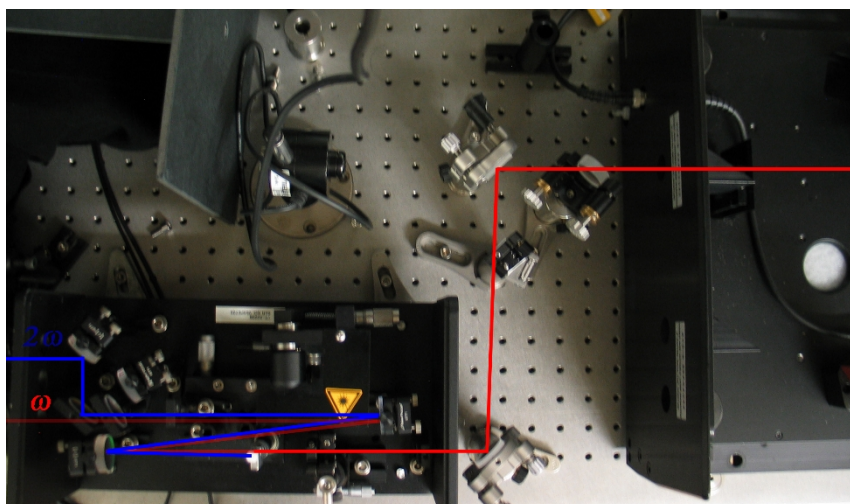


Figura 3.14 – Foto do instrumento de geração de segundo harmónico e respetiva ilustração. O feixe pulsado constituído pela seleção de pulsos do feixe original, é convertido com alta eficiência por um cristal, num feixe pulsado com um comprimento de onda que é metade do original.

A estrutura híbrida final era colocada numa plataforma movida em duas direções com o auxílio de um motor bidirecional com uma precisão de 20 nm. O feixe laser era focado na amostra através de uma objetiva com um fator de ampliação 100x e uma abertura numérica de 0.7. Esta era ajustada através de um motor piezoelétrico com uma sensibilidade de 2nm. A radiação fluorescente, proveniente da molécula, era focada num

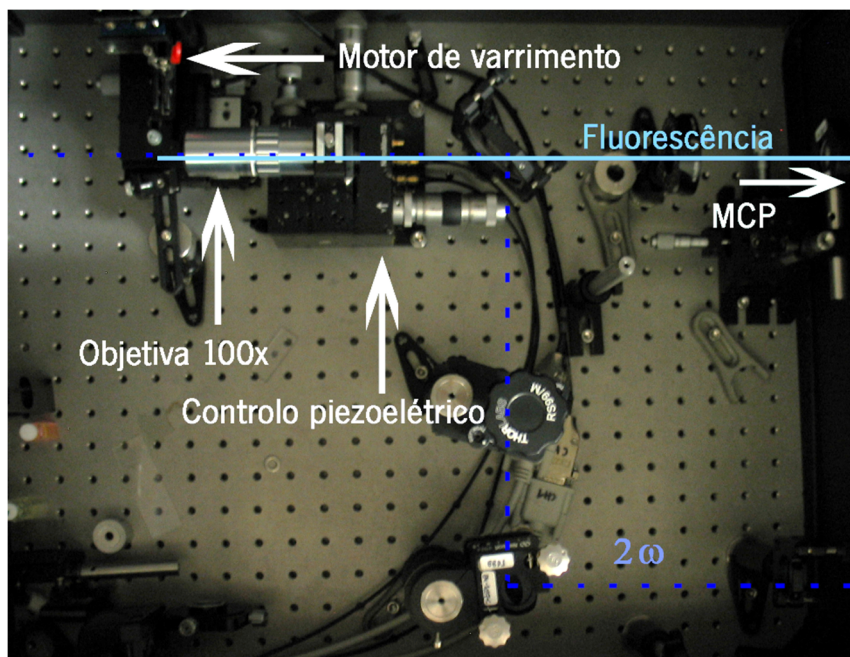


Figura 3.15 – Foto da montagem experimental do sistema FLIM e respetiva legenda. Composto por, uma objetiva com uma magnificação de 100x e uma abertura numérica de 0.7; um motor bidimensional XY que permite efetuar um varrimento da amostra de modo a obter uma imagem com os perfis de decaimentos em cada pixel. A aquisição é efetuada por um fotomultiplicador de multicanais (MCP) Hamamatsu R3809U-51 que envia o sinal referente para uma placa B&H SPC-150 para a agrupação em histograma.

duplo monocromador, usado para selecionar o comprimento de onda de emissão da molécula, e só então chegava ao fotomultiplicador de multicanais Hamamatsu R3809U-51, usados para detetar os fótons do decaimento, ver figura 3.15. Foi usada uma placa B&H SPC-150, da empresa *Becker&Hickl GmbH*®, para registar os dados experimentais, a sua arquitetura (Figura 2.11) permite efetuar vários tipos de registos experimentais, sendo TCSPC e FLIM os modos aquisição usados nesta experiência. A análise posterior dos dados adquiridos era efetuada recorrendo ao *software* disponibilizado pela empresa Becker & Hickl para análise das imagens FLIM e para a análise dos espectros TCSPC foi usado o *software* Fluofit da empresa Picoquant®.

A partir da análise das imagens FLIM das amostras de grafeno eram retiradas conclusões fundamentais sobre as estruturas construídas, como verificar a presença ou ausência de defeitos nas estruturas (Figura 3.7), a homogeneidade das camadas sobre a amostra de grafeno e a observação direta da inibição da fluorescência pelo grafeno (Figura 3.17).

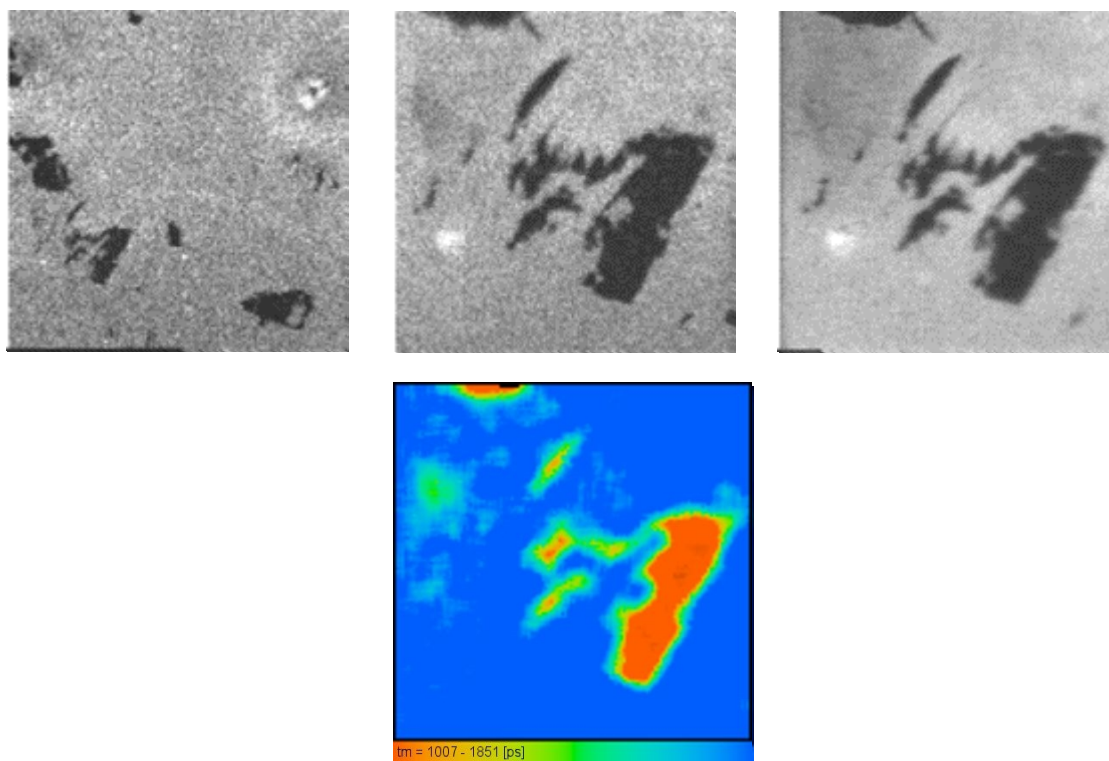


Figura 3.16 – No topo, da esquerda para a direita, sequência na identificação e referenciação de uma amostra de grafeno (Figura 3.11) pela microscopia FLIM. Em baixo imagem FLIM onde é possível verificar a inibição da fluorescência da molécula perylene à distância de 15 nm do grafeno.

A imagem FLIM, como já mencionei carece de informação, ou seja, baixo número de fótons em cada pixel, o que não permite uma análise aprofundada do perfil de decaimento. Tirando partido do modo como era obtida, através do varrimento da amostra ponto a ponto, foi usada como meio de referenciamento de posições singulares, na presença e na ausência de grafeno, onde os respetivos perfis da molécula fluorescente

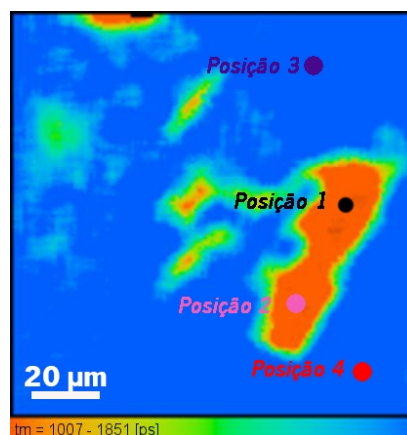


Figura 3.17 – Imagem FLIM da amostra da figura 3.16 onde estão marcados os pontos selecionados e referenciados para a aquisição singular dos perfis de decaimento pela técnica TCSPC.

foram obtidos através da técnica TCSPC, para o estudo da inibição da fluorescência pelo grafeno.

Estes passos, obtenção da imagem FLIM, a sua análise, referenciamentos de posições singulares e aquisição do perfil de decaimento da molécula por TCSPC, na presença e na ausência de grafeno, foram tomados como o padrão para a realização da experiência.

Como é possível ver na figura 3.17 as extremidades da amostra de grafeno não possui uma boa definição, isto ocorre devido a dificuldade de focagem da amostra. Contudo, a escolha dos pontos singulares na presença e na ausência do grafeno foi efetuada o mais afastado possível das extremidades do grafeno e da grafite de modo a extinguir os efeitos associados. Referenciados os pontos (Figura 3.17) procedeu-se a aquisição singular através da técnica TCSPC.

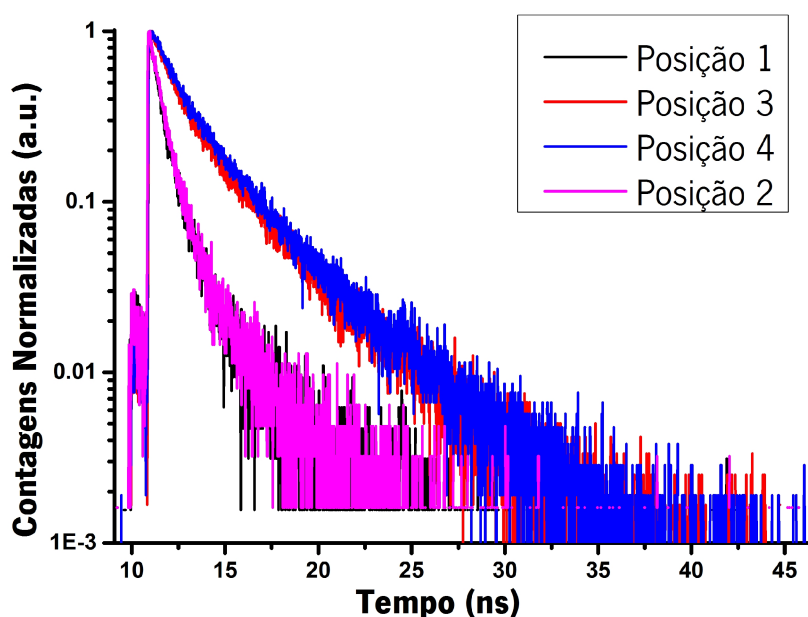


Figura 3.18 – Perfil experimental do decaimento da molécula perylene, adquiridos pela técnica TCSPC, nos pontos marcados na figura 3.17.

A microscopia FLIM também serviu como meio de confirmação da aquisição pontual dos perfis de decaimento. Após a aquisição era efetuado um novo varrimento da amostra e obtida uma nova imagem FLIM, na qual se observava a fotodegradação da camada dopada devido a efeitos térmicos, resultante da longa exposição à radiação. A fotodegradação pontual confirmava os locais onde a aquisição singular ocorreu, ver figura 3.19.

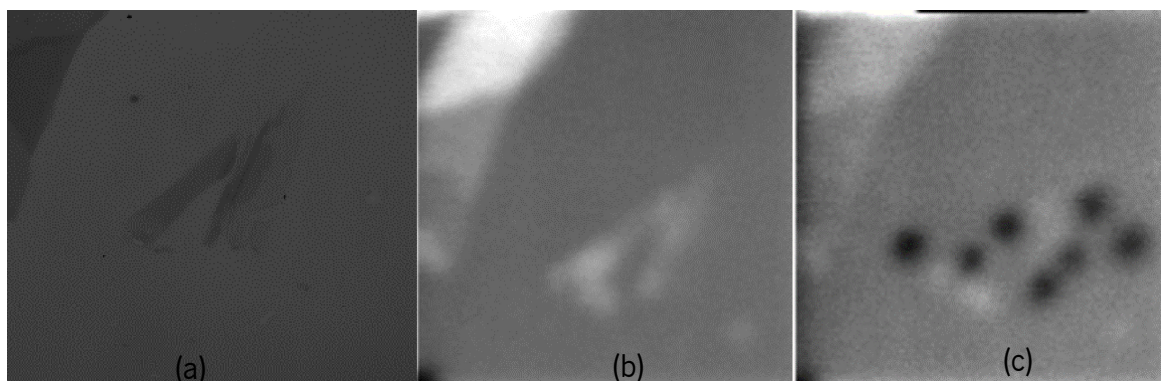


Figura 3.19 – A microscopia FLIM permite a visualização da amostra de grafeno (a) (visualização da amostra em microscópio ótico de reflexão) através da obtenção da imagem FLIM (b) através da qual eram selecionados pontos singulares para a obtenção singular de perfis de decaimento. Tirando uma nova imagem FLIM, após a aquisição dos perfis singulares (c), confirmava a posição da aquisição.

Resultados e análise

Os dados experimentais do perfil de decaimento da molécula perylene imobilizada na camada de PMMA, obtidos numa posição individual, na presença e na ausência do grafeno pela técnica TCSPC, foram ajustados através de duas exponenciais pelo *software* FluoFit da PicoQuant©. A escolha de duas exponenciais não significa que existam duas espécies fluorescentes, ou dois estados da mesma espécie na camada dopada. Elas representam uma distribuição de tempos de decaimento resultantes da característica sólida da camada dopada, as ligeiras variações da densidade de moléculas perylene e da sua espessura, o que resulta em diferentes ambientes circundantes sentido pelas moléculas, individualmente. O resultado final é uma distribuição de tempos de decaimento em vez de um simples decaimento mono exponencial como em solução. De facto, em solução as moléculas também presenciam diferentes ambientes circundante, mas é compensado pela rápida dinâmica do meio durante a excitação, enquanto numa matriz sólida, como é o caso, a dinâmica é muito mais lenta que decaimento do estado excitado. Na verdade um bom ajuste seria efetuado através de uma exponencial estendida (*Stretched exponential*) mas devido a sua natureza não trivial da distribuição ao longo do tempo, torna a sua análise exaustiva e não vantajosa para o estudo em questão.

Uma distribuição de intensidades de decaimentos é expressa através das componentes individuais de decaimento (τ) dada por,

$$I(\tau, t) = \alpha(\tau)e^{-t/\tau} \quad (3.11)$$

Experimentalmente apenas observamos o tempo de decaimento do ensemble, sendo impossível observar as componentes individuais. Para o ensemble o tempo de decaimento é dado pela soma de todas as componentes,

$$I(\tau, t) = \int_{\tau=0}^{\infty} \alpha(\tau)e^{-t/\tau} d\tau \quad (3.12)$$

Sendo,

$$\int_{\tau=0}^{\infty} \alpha(\tau) d\tau = 1 \quad (3.13)$$

Podemos argumentar que isto é um decaimento multi-exponencial, sendo que a $\alpha(\tau)$ é a soma discreta de componentes, ou seja,

$$\alpha(\tau) = \sum_i g_i \alpha_i(\tau) = \sum_i \alpha_i(\tau) \quad (3.14)$$

onde i representa a i -ésima componente da distribuição centrada em α_i , com g_i a representar a sua amplitude. Analogamente, podemos escrever uma distribuição de decaimentos como um decaimento multi-exponencial.

$$I(t) = \sum_i \alpha_i e^{-t/\tau_i} \quad (3.15)$$

Para o estudo da inibição da fluorescência pelo grafeno foi usado o tempo médio, resultantes do ajuste multi-exponencial dado por,

$$\tau_m = \sum_i \alpha_i \tau_i \quad (3.16)$$

onde α_i e τ_i são respetivamente a amplitude e o tempo de decaimento correspondentes das componente exponenciais, sendo que, $\sum_i \alpha_i = 1$. O tempo médio não é igual ao tempo obtido por um ajuste mono-exponencial mas é o valor correto para o cálculo da eficiência de transferência de energia pelos mecanismos não radiativos resultantes da interação dipolo-dipolo.

No programa FluoFit foi escolhido o método dos mínimos quadrados não lineares (*Non-Linear Least Squares*) para a realização do ajuste e extração dos tempos de decaimentos da distribuição. Este algoritmo encontra o melhor ajuste aos pontos experimentais minimizando a soma dos quadrados das distâncias entre os pontos experimentais e a função de ajuste. A distância final é designada por resíduos. Em suma, o algoritmo tenta encontrar os melhores parâmetros de ajuste entre os dados experimentais $N(t_k)$ e a função de ajuste $N_f(t_k)$ de modo a obter um valor reduzido para o chi-quadrado (χ^2), sendo o seu valor calculado por,

$$\chi^2 = \frac{1}{\nu} \sum_{k=1}^n \frac{[N(t_k) - N_f(t_k)]^2}{\sigma_k^2} = \frac{1}{\nu} \sum_{k=1}^n \frac{[N(t_k) - N_f(t_k)]^2}{N(t_k)} \quad (3.17)$$

onde ν representa os graus de liberdade do sistema. Para a estatística de Poisson, usada, o desvio padrão σ_k é igual a raiz quadrada do número de pontos experimentais $\sqrt{N(t_k)}$ e um bom ajuste possui um valor χ^2 reduzido ($\chi^2 \approx 0$). O parâmetro usado para ver a qualidade do ajuste foi o chi-quadrado reduzido (χ_R^2), e um bom ajuste possui um $\chi_R^2 \approx 1$

$$\chi_R^2 = \frac{\chi^2}{\nu} \quad (3.18)$$

Em conclusão, foi considerado um bom ajuste para os pontos experimentais os que apresentava $\chi_R^2 \approx 1$ e uma baixa amplitude de resíduos.

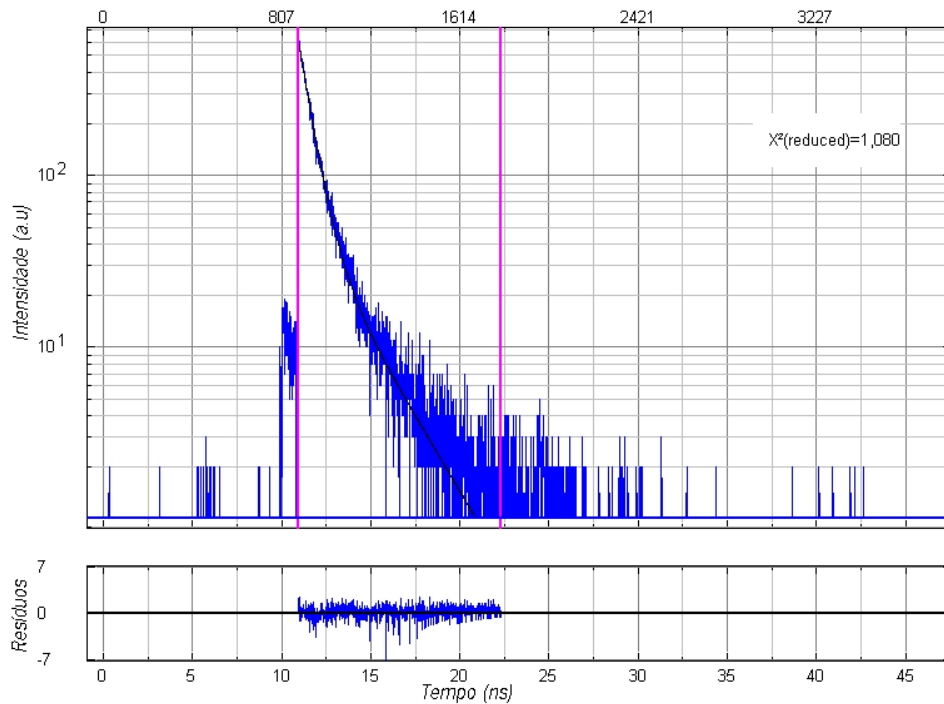


Figura 3.20 – Perfil experimental do decaimento da fluorescência da espécie perylene imobilizada na camada de PMMA (azul), ao qual foi efetuado um ajuste de duas exponenciais de acordo com a equação (3.15) (linha preta). Uma constante e baixa magnitude dos resíduos e um chi-quadrado reduzido perto da unidade indicam um ajuste adequado.

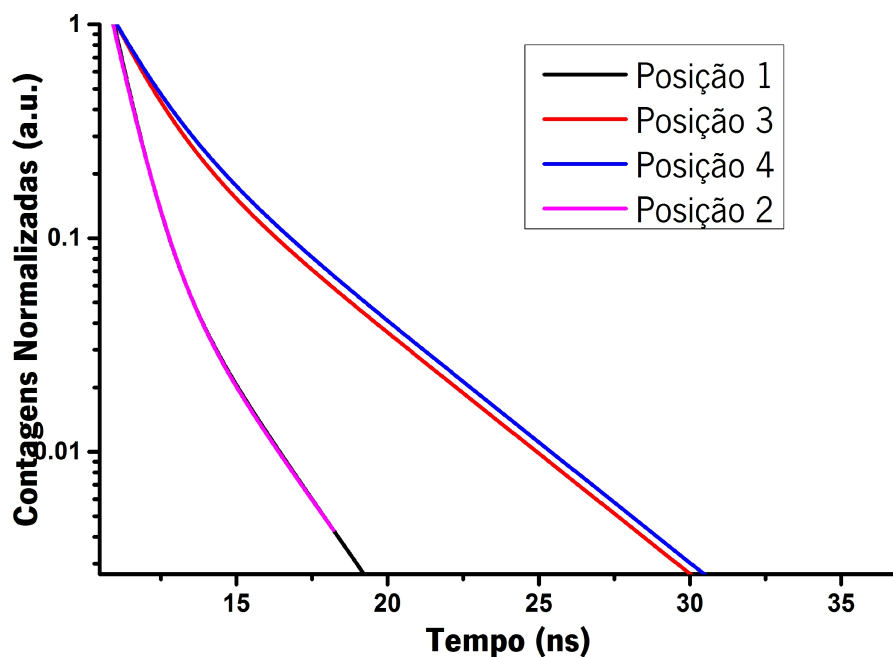


Figura 3.21 – Ajuste, mencionado na figura 3.20, e efetuado aos perfis experimentais de decaimento correspondentes as posições referenciadas na figura 3.17.

Efetuando o ajuste aos pontos experimentais e obtidos os tempos médios (τ_m) referentes a cada posição, o cálculo da eficiência da transferência de energia era alcançado efetuando a média de todas as combinações possíveis para o seu cálculo. Isto é, tome-se o caso da amostra referente a distância de 15 nm presente na tabela 3.2, o cálculo do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) pode ser efetuado pelas razões,

$$1 - \frac{\tau_{\text{posição1}}}{\tau_{\text{posição3}}}; \quad 1 - \frac{\tau_{\text{posição1}}}{\tau_{\text{posição4}}}; \quad 1 - \frac{\tau_{\text{posição2}}}{\tau_{\text{posição3}}}; \quad 1 - \frac{\tau_{\text{posição2}}}{\tau_{\text{posição4}}}$$

o valor médio destas quatro combinações foi utilizado como valor experimental do rendimento quântico de fluorescência.

Distância	Posição	Amostra	FluoFit®					Φ_F	$\langle \Phi_F \rangle \pm \sigma_P$
			τ_1	τ_2	a_1	a_2	τ_m		
0 nm	1	Grafeno	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00 ± 0.01
	3		1.104	3.304	81	96	2.30	0.00	
	4		1.026	3.395	132	126	2.18	0.00	
	2	Grafeno	0	0	0	0	0.00	0.00	
5 nm	1	Grafeno	0	0	0	0	0	0.00	0.00 ± 0.01
	4		1.263	3.56	72	44	2.13	0.00	
	3		1.544	3.881	144	54	2.18	0.00	
	2	Grafeno	0	0	0	0	0	0.00	
15 nm	1	Grafeno	0.616	2.135	516	76	0.81	0.38	0.37 ± 0.02
	3		1.173	3.856	753	436	2.16	0.35	
	4		1.279	3.85	623	444	2.35	0.38	
	2	Grafeno	0.645	2.19	544	74	0.83	0.35	
17 nm	1	Grafeno	0.597	1.824	260	57	0.82	0.41	0.40 ± 0.01
	3		1.121	3.242	263	191	2.01	0.39	
	4		1.155	3.433	180	132	2.12	0.41	
	2	Grafeno	0.613	1.914	262	52	0.83	0.39	
20 nm	1	Grafeno	0.748	2.639	451	33	0.88	0.54	0.52 ± 0.01
	3		0.974	3.228	496	207	1.64	0.53	
	4		1.013	3.237	446	183	1.66	0.52	
	2	Grafeno	0.656	1.954	423	73	0.85	0.51	
23 nm	1	Grafeno	0.903	2.764	234	145	1.61	0.72	0.73 ± 0.01
	3		1.431	3.743	272	149	2.25	0.72	
	4		1.264	3.502	226	179	2.25	0.74	
	2	Grafeno	0.871	2.557	178	161	1.67	0.74	
26 nm	1	Grafeno	0.627	1.916	245	142	1.10	0.73	0.75 ± 0.02
	3		0.859	2.689	346	187	1.50	0.77	
	4		0.852	2.626	452	215	1.42	0.72	
	2	Grafeno	0.714	2.119	296	107	1.09	0.76	
32 nm	1	Grafeno	1.239	3.142	1480.75	861.18	1.94	0.79	0.80 ± 0.02
	3		1.428	3.783	1372.25	1073.17	2.46	0.78	
	4		1.396	3.799	1746.04	1421	2.47	0.82	
	2	Grafeno	1.209	3.174	1376	972.38	2.02	0.82	
42 nm	1	Grafeno	2.119	4.583	664	950	3.57	0.84	0.82 ± 0.01
	3		2.475	4.888	400	1148	4.26	0.84	
	4		2.536	4.92	421	1104	4.26	0.81	
	2	Grafeno	1.886	4.517	615	902	3.45	0.81	
50 nm	1	Grafeno	1.32	3.606	1159.45	948.19	2.35	0.88	0.89 ± 0.01
	3		1.488	3.801	1315.46	1377.9	2.67	0.89	
	4		1.498	3.796	1417.18	1374.16	2.63	0.88	
	2	Grafeno	1.308	3.587	1150	971	2.35	0.89	
60 nm	1	Grafeno	1.156	3.463	922.73	596	2.06	0.96	0.97 ± 0.01
	3		1.255	3.622	1295.4	770.85	2.14	0.95	
	4		1.22	3.572	1168.34	799.75	2.18	0.99	
	2	Grafeno	1.181	3.47	916.64	634.93	2.12	0.97	

Tabela 3.2 – Resultados e análise dos dados experimentais a partir dos quais foi calculado o rendimento quântico da molécula perylene na presença do grafeno a várias distâncias e o respetivo desvio padrão (σ_P).

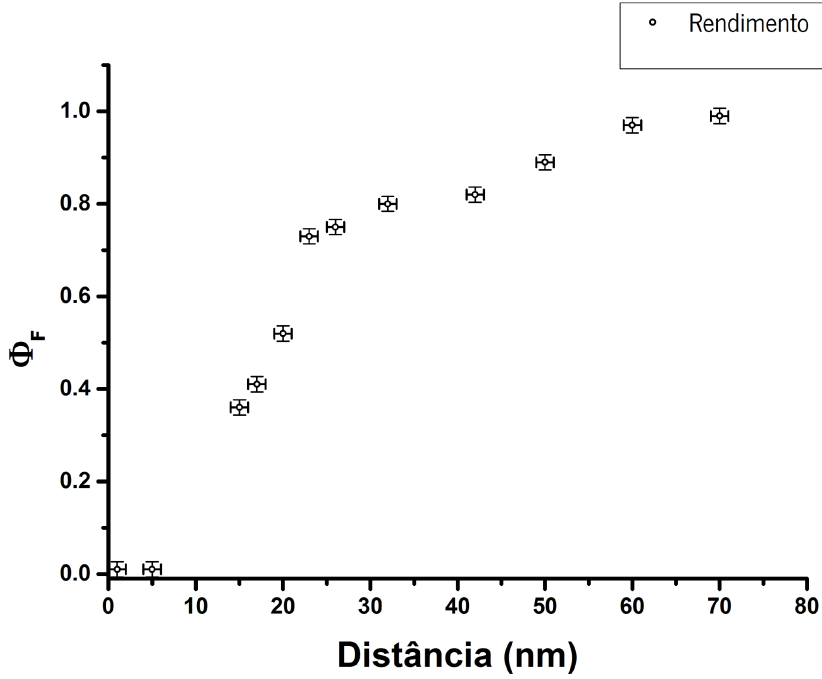


Figura 3.22 – Representação dos dados experimentais para o rendimento quântico do estado excitado da molécula perylene na presença do grafeno a várias distâncias.

Os pontos experimentais do rendimento quântico de fluorescência foram ajustados à teoria (equação (2.19)) através da equação (3.19).

$$\Phi_F = \left[1 + A \left(\frac{\lambda}{r} \right)^4 + B \left(\frac{\lambda}{r} \right)^2 \right]^{-1} \quad (3.19)$$

As contribuições com dependência quadrática da distância foram agrupadas e associado o parâmetro de ajuste B . Em termos experimentais não há como efetuar uma separação das duas dependências quadráticas da distância. A contribuição com uma dependência da distância de quarta ordem foi associado o parâmetro de ajuste A . Estes parâmetros A, B contém a informação referente a todas as contribuições dos pré-fatores assim como os coeficientes geométricos associados presentes na teoria.

O comprimento de onda de emissão (λ) onde foi efetuada a aquisição singular é 440 nm, corresponde ao máximo de emissão, ver figura 3.10. Foi usado o algoritmo *Levenberg-Marquardt* oferecido pelo programa *Origin®*. O ajuste aos pontos experimentais

está representado na figura 3.23, onde também é possível verificar um parâmetro de ajuste R^2 próximo da unidade ($R^2 = 0.985$), o que indica uma convergência para a teoria.

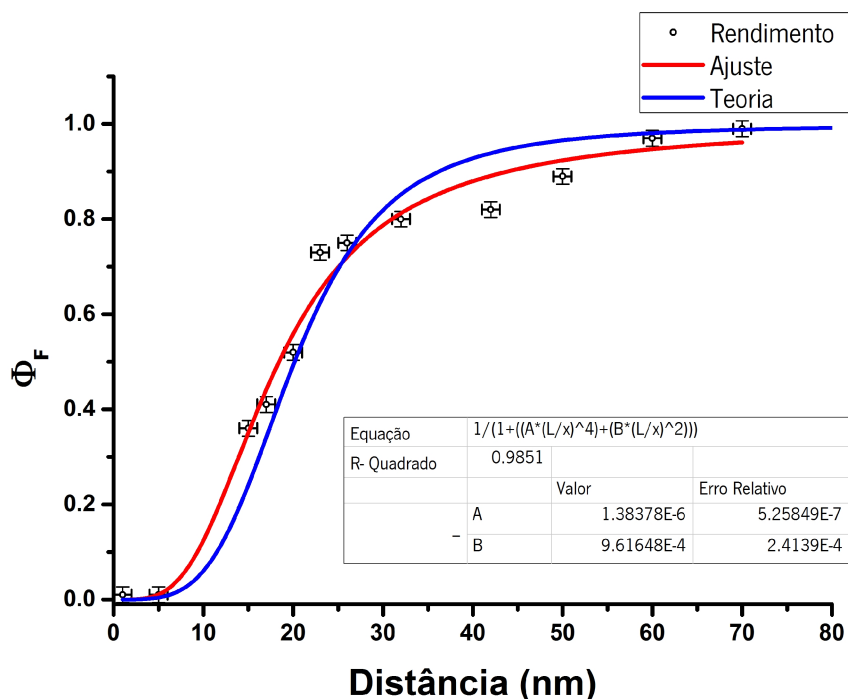


Figura 3.23 – Ajuste dos dados experimentais representados figura 3.22 através da expressão (3.19). Está também representada a teoria correspondente ao comprimento de onda 440 nm efetuada através da equação (2.19).

Num total de 12 medições experimentais efetuadas a 12 estruturas híbridas, com 12 distâncias diferentes entre a amostra de grafeno e um filme dopado com a molécula fluorescente perylene, onde os respetivos valores estão disponibilizados na tabela 3.2, e pela análise do ajuste efetuado aos dados, referentes ao rendimento quântico de fluorescência representados na figura 3.23 com os respetivos parâmetros de ajuste, verifica-se uma ótima conformidade com a teoria, também ela representada na mesma figura e que corresponde a equação (2.19). Em suma grafeno possui uma inibição da fluorescência a longas distâncias, sendo 62 nm a distância máxima para a qual se observou inibição da fluorescência pelo grafeno. Esta distância representa um alcance muito superior à distância típica admitida pelo FRET comum, entre duas espécies fluorescentes, usado exhaustivamente em estudos biológicos.

Capítulo 4

Conclusões e Perspetivas

Inibição da fluorescência a longas distâncias entra no leque de propriedades únicas do grafeno, e abre portas a uma nova era de aplicabilidade do grafeno e do mecanismo FRET. Em conjunto, grafeno e FRET representam uma revolução num futuro próximo em áreas como a biologia e no novo ramo de investigação *plasmonics*.

A sua baixa toxicidade faz dele um material ideal para estudos biológicos, decifração do ADN (Avdoshenko et al.) ou o uso como uma plataforma de entrega controlada de fármacos (Yang et al.), são alguns exemplos descritos na literatura. Esta propriedade contudo, vem aumentar a sua ação, por exemplo a entrega é simultaneamente monitorizada pelo próprio grafeno usando o mecanismo FRET. Estruturas para este fim necessitam de ser idealizada, estudas e otimizadas.

Assim como a observação da dependência a grandes distâncias, também será benéfico verificar a dependência da polarização na ativação dos diferentes canais, com dependência quadrática da distância, presentes na inibição da fluorescência pelo grafeno. Para isso será necessário alinhar todos os dipolos das espécies fluorescentes paralelamente e perpendicularmente, em diferentes estruturas híbridas, com a superfície do grafeno, uma tarefa que só por si, já é um grande desafio. A verificação experimental desta dependência será de grande interesse em áreas de investigação como o ramo *plasmonics*. Estudos recentes sugerem também que é possível controlar a interação entre duas espécies fluorescentes através da resposta plasmónica do grafeno, mediando assim o aumento ou a diminuição da radiação fluorescente (Huidobro et al.). A convergência destas duas propriedades poderá ser a base de novos dispositivos óticos.

Recentemente foi demonstrado que é possível selecionar e alterar a propagação de plasmões através de radiação polarizada (Lin et al.; Rodríguez-Fortuño et al.). Diferentes polarizações ativam plasmões com diferentes direções de propagação ativados por estruturas ou acoplamentos especiais. Esta relação permite a seleção e manipulação de plasmões singulares, o que é de grande importância para o desenvolvimento de computação quântica e guia de ondas eletromagnética numa escala inferior ao limite de refração. O estudo dos efeitos deste tipo de padronização e dos acoplamentos mencionados na ativação de plasmões em grafeno, e a sua possível manipulação pela polarização da radiação, é tema de estudo para um futuro próximo. Todas estas interações de campo próximo em combinação com o grafeno são um meio para o estudo da física fundamental neste regime e nesta gama de dimensionalidade possibilitando a descoberta de novos fenómenos físicos.

Bibliografia

Livros

1. Joseph R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy* [3rd ed.], Springer, 2006
2. Heinz Raether, *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings*, Springer Tracts in Modern Physics, 1988.
3. Charles Kittel, *Introduction to Solid State Physics* [8 ed.], Wiley, 2004.
4. Mikhail I. Katsnelson, *Graphene Carbon in Two Dimensions*, Cambridge University Press, 2012.
5. Richard A. L. Jones, Randal W. Richards, *Polymers at Surfaces and Interfaces*, Cambridge University Press, 1999.

Literatura

- Alcoutlabi, Matatz, and Gregory B McKenna. "Effects of Confinement on Material Behaviour at the Nanometre Size Scale." *Journal of Physics: Condensed Matter* 17.15 (2005): R461–R524.
- Algar, W R, and U J Krull. "Quantum Dots as Donors in Fluorescence Resonance Energy Transfer for the Bioanalysis of Nucleic Acids, Proteins, and Other Biological Molecules." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2008 : 1609–1618.
- Aslan, K, J R Lakowicz, and C D Geddes. "Plasmon Light Scattering in Biology and Medicine: New Sensing Approaches, Visions and Perspectives." *Current Opinion in Chemical Biology* 2005 : 538–544.
- Avdoshenko, Stanislav M et al. "Dynamic and Electronic Transport Properties of DNA Translocation through Graphene Nanopores." *Nano letters* 13.5 (2013): 1969–76.
- Bernardo, César et al. "Efficient Preparation of Graphene by Combined Intercalation." *in preparation* n. pag. Print.

-
- Blake, P. et al. "Making Graphene Visible." *Applied Physics Letters* 91.6 (2007): 063124–. Web. 18 Oct. 2013.
- Borst, Jan Willem, and Antonie J W G Visser. "Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy in Life Sciences." *Measurement Science and Technology* 21.10 (2010): 102002.
- Butler, Sheneve Z et al. "Progress, Challenges, and Opportunities in Two-Dimensional Materials Beyond Graphene." *ACS nano* 7.4 (2013): 2898–926.
- Castro Neto, A H et al. "The Electronic Properties of Graphene." Ed. K H Jürgen Buschow et al. *Reviews of Modern Physics* 81.1 (2009): 109–162.
- Chan, F T S, C F Kaminski, and G S K Schierle. "HomoFRET Fluorescence Anisotropy Imaging as a Tool to Study Molecular Self-Assembly in Live Cells." *Chemphyschem* 2011 : 500–509.
- Choi, Jae-Young. "Graphene Transfer: a Stamp for All Substrates." *Nature nanotechnology* 8.5 (2013): 311–2.
- Das Sarma, S., and Qiuzi Li. "Intrinsic Plasmons in Two-Dimensional Dirac Materials." *Physical Review B* 87.23 (2013): 235418.
- Dean, C R et al. "Boron Nitride Substrates for High-Quality Graphene Electronics." *Nature nanotechnology* 5.10 (2010): 722–6.
- Dorn, M. et al. "High Contrast Optical Detection of Single Graphenes on Optically Transparent Substrates." *Journal of Applied Physics* 108.10 (2010): 106101.
- Fang, Q et al. "Inverted Opal Fluorescent Film Chemosensor for the Detection of Explosive Nitroaromatic Vapors through Fluorescence Resonance Energy Transfer." *Chemistry*. 2009 : 11507–11514.
- Gao, F et al. "A DNA Hybridization Detection Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer Between Dye-Doped Core-Shell Silica Nanoparticles and Gold Nanoparticles." *Analyst* 2011 : 3973–3980.
- Garcia-Sanchez, D et al. "Imaging Mechanical Vibrations in Suspended Graphene Sheets." *Nano Letters* 8.5 (2008): 1399–1403.
- Gaudreau, L et al. "Universal Distance-Scaling of Nonradiative Energy Transfer to Graphene." *Nano letters* 13.5 (2013): 2030–5.
- Geim, A K, and K S Novoselov. "The Rise of Graphene³¹⁰." *Nature Materials* 6.3 (2007): 183–191.
-

- Gómez-Santos, G, and T. Stauber. "Fluorescence Quenching in Graphene: A Fundamental Ruler and Evidence for Transverse Plasmons." *Physical Review B* 84.16 (2011): 165438.
- Gonçalves, Hugo, Luís Alves, et al. "Enhancement of Graphene Visibility on Transparent Substrates by Refractive Index Optimization." *Optics Express* 21.10 (2013): 12934–12941.
- Gonçalves, Hugo, Michael Belsley, et al. "Enhancing Visibility of Graphene on Arbitrary Substrates by Microdroplet Condensation." *Applied Physics Letters* 97.23 (2010): 12.
- Grigorenko, A. N., M. Polini, and K. S. Novoselov. "Graphene Plasmonics." *Nature Photonics* 6.11 (2012): 749–758.
- Hajisalem, Ghazal et al. "Plasmon Hybridization for Enhanced Nonlinear Optical Response." *Optics express* 20.28 (2012): 29923–30.
- Henrie, Justin et al. "Electronic Color Charts for Dielectric Films on Silicon." *Optics Express* 12.7 (2004): 1464.
- Hildner, Richard et al. "Quantum Coherent Energy Transfer over Varying Pathways in Single Light-Harvesting Complexes." *Science* 340.6139 (2013): 1448–1451.
- Hodge, I. M. "Effects of Annealing and Prior History on Enthalpy Relaxation in Glassy Polymers. 4. Comparison of Five Polymers." *Macromolecules* 16.6 (1983): 898–902.
- Huh, Yun Suk, Aram J. Chung, and David Erickson. "Surface Enhanced Raman Spectroscopy and Its Application to Molecular and Cellular Analysis." *Microfluidics and Nanofluidics* 6.3 (2009): 285–297.
- Huidobro, P. A. et al. "Superradiance Mediated by Graphene Surface Plasmons." *Physical Review B* 85.15 (2012): 155438. Web. 17 Oct. 2013.
- Koppens, Frank H L et al. "Graphene Plasmonics: A Platform for Strong Light-Matter Interactions." *Nano Letters* 11.8 (2011): 3370–3377.
- Lin, Jiao et al. "Polarization-Controlled Tunable Directional Coupling of Surface Plasmon Polaritons." *Science (New York, N.Y.)* 340.6130 (2013): 331–4.
- Liu, Jie et al. "Differentiation of Tumor Sensitivity to Photodynamic Therapy and Early Evaluation of Treatment Effect by Nuclear Medicine Techniques." *Annals of nuclear medicine* 27.7 (2013): 669–75.
- Lu, Shaoying, and Yingxiao Wang. "Fluorescence Resonance Energy Transfer Biosensors for Cancer Detection and Evaluation of Drug Efficacy." *Clin. Cancer Res.* 16.15 (2010): 3822–3824.

-
- Ma, Ren-Min et al. "Plasmon Lasers: Coherent Light Source at Molecular Scales." *Laser & Photonics Reviews* 7.1 (2013): 1–21.
- Marcu, L., and B. A. Hartl. "Fluorescence Lifetime Spectroscopy and Imaging in Neurosurgery." *Ieee Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* 18.4 (2012): 1465–1477.
- Master, Alyssa, Megan Livingston, and Anirban Sen Gupta. "Photodynamic Nanomedicine in the Treatment of Solid Tumors: Perspectives and Challenges." *Journal of Controlled Release* 168.1 (2013): 88–102.
- Molitor, F et al. "Electronic Properties of Graphene Nanostructures." Ed. K H Jürgen Buschow et al. *Journal of physics Condensed matter an Institute of Physics journal* 23.24 (2011): 243201.
- Nair, R R et al. "Fine Structure Constant Defines Visual Transparency of Graphene." *Science* 320.5881 (2008): 1308.
- Novoselov, K S, A K Geim, S V Morozov, D Jiang, Y Zhang, et al. "Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films." *Science* 306.5696 (2004): 666–9.
- Novoselov, K S, D Jiang, et al. "Two-Dimensional Atomic Crystals." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102.30 (2005): 10451–10453.
- Novoselov, K S, A K Geim, S V Morozov, D Jiang, M I Katsnelson, et al. "Two-Dimensional Gas of Massless Dirac Fermions in Graphene." Ed. Eileen Trauth et al. *Nature* 438.7065 (2005): 197–200.
- Novoselov, K S, A H Castro Neto, and A H C Neto. "Two-Dimensional Crystals-Based Heterostructures: Materials with Tailored Properties." *Physica Scripta* T146.T146 (2012): 014006.
- Othman, A B et al. "Calix[4]arene-Based, Hg²⁺ -Induced Intramolecular Fluorescence Resonance Energy Transfer Chemosensor." *J.Org.Chem.* 2007 : 7634–7640. Print.
- Oulton, Rupert F. "Surface Plasmon Lasers: Sources of Nanoscopic Light." *Materials Today* 15.1 (2012): 26–34.
- Peres, N M R et al. "Exact Solution for Square-Wave Grating Covered with Graphene: Surface Plasmon-Polaritons in the Terahertz Range." *Journal of Physics-Condensed Matter* 25.12 (2013): 125303.
- Peres, N. M. R. "Colloquium: The Transport Properties of Graphene: An Introduction." *Reviews of Modern Physics* 82.3 (2010): 2673–2700.
-

- Perry, Seth W, Ryan M Burke, and Edward B Brown. "Two-Photon and Second Harmonic Microscopy in Clinical and Translational Cancer Research." *Annals of Biomedical Engineering* 40.2 (2012): 277–291.
- Pile, David. "Plasmonics: Graphene Shrinks Light." *Nature Photonics* 7.7 (2013): 511–511. Web. 11 Oct. 2013.
- Rodríguez-Fortuño, Francisco J et al. "Near-Field Interference for the Unidirectional Excitation of Electromagnetic Guided Modes." *Science (New York, N.Y.)* 340.6130 (2013): 328–30.
- Roth, Connie B., and John R. Dutcher. "Glass Transition and Chain Mobility in Thin Polymer Films." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 584.1 (2005): 13–22.
- Sahu, Abhishek et al. "Graphene Oxide Mediated Delivery of Methylene Blue for Combined Photodynamic and Photothermal Therapy." *Biomaterials* 34.26 (2013): 6239–6248.
- Scholes, Gregory D. et al. "Solar Light Harvesting by Energy Transfer: From Ecology to Coherence." *Energy & Environmental Science* 5.11 (2012): 9374–9393.
- Schuller, J A et al. "Plasmonics for Extreme Light Concentration and Manipulation." *Nature Materials* 2010 : 193–204.
- Sheng, Xian-Lei et al. "T-Carbon: A Novel Carbon Allotrope." *Physical Review Letters* 106.15 (2011): 155703.
- Sorger, Volker J, and Xiang Zhang. "Physics. Spotlight on Plasmon Lasers." *Science (New York, N.Y.)* 333.6043 (2011): 709–10.
- Stiles, Paul L. et al. "Surface-Enhanced Raman Spectroscopy." *Annual Review of Analytical Chemistry* (2008): 601-626.
- Swathi, R S, and K L Sebastian. "Long Range Resonance Energy Transfer from a Dye Molecule to Graphene Has (distance)⁽⁻⁴⁾ Dependence⁸³." *Journal of Chemical Physics* 130.8 (2009): 086101.
- Velizhanin, K A, and A Efimov. "Probing Plasmons in Graphene by Resonance Energy Transfer." *Physical Review B* 2011 : 085401–085408.
- Wallace, P. "The Band Theory of Graphite." *Physical Review* 71.9 (1947): 622–634.
- Wallrabe, Horst, and Ammasi Periasamy. "Imaging Protein Molecules Using FRET and FLIM Microscopy." *Current Opinion in Biotechnology* 16.1 (2005): 19–27.
- Walsh, Christopher B., and Elias I. Franses. "Ultrathin PMMA Films Spin-Coated from Toluene Solutions." *Thin Solid Films* 429.1 (2003): 71–76.

-
- Weigert, R., N. Porat-Shliom, and P. Amornphimoltham. "Imaging Cell Biology in Live Animals: Ready for Prime Time." *Journal of Cell Biology* 201.7 (2013): 969–979.
- Wu, C S, M K K Oo, and X D Fan. "Highly Sensitive Multiplexed Heavy Metal Detection Using Quantum-Dot-Labeled DNAzymes." *Acs Nano* 2010 : 5897–5904.
- Yan, Hugen et al. "Tunable Infrared Plasmonic Devices Using Graphene/insulator Stacks." *Nature nanotechnology* 7.5 (2012): 330–4.
- Yang, X Y et al. "Multi-Functionalized Graphene Oxide Based Anticancer Drug-Carrier with Dual-Targeting Function and pH-Sensitivity." *Journal of Materials Chemistry* 2011 : 3448–3454.
- Zhao, Yiming et al. "Near-Infrared Fluorescence Energy Transfer Imaging of Nanoparticle Accumulation and Dissociation Kinetics in Tumor-Bearing Mice." *ACS nano* (2013).